

博士論文

新規アシル CoA：コレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害薬
NTE-122 の薬理学的特性に関する研究

平成 12 年 3 月

東 幸 雅

①

博士論文

新規アシル CoA : コレステロールアシルトランスフェラーゼ阻害薬
NTE-122 の薬理学的特性に関する研究

平成 12 年 3 月

東 幸雅

目 次

略号表	iii
緒 論	1
第1章 ACAT 阻害作用と他の脂質代謝酵素活性に対する作用	9
1 緒言	9
2 実験材料ならびに実験方法	10
3 実験結果	21
4 考察	33
5 小括	35
第2章 培養肝細胞のアポリポタンパク B 含有リポタンパク質分泌および胆汁酸分泌に対する作用	36
1 緒言	36
2 実験材料ならびに実験方法	37
3 実験結果	41
4 考察	47
5 小括	49
第3章 培養腸粘膜細胞の脂質分泌に対する作用	50
1 緒言	50
2 実験材料ならびに実験方法	50
3 実験結果	54

4 考察	57
5 小括	58
第4章 培養マクロファージ細胞の泡沫化抑制および脱泡沫化促進作用	59
1 緒言	59
2 実験材料ならびに実験方法	62
3 実験結果	65
4 考察	70
5 小括	72
第5章 コレステロール負荷動物におけるコレステロール低下作用	73
1 緒言	73
2 実験材料ならびに実験方法	73
3 実験結果	77
4 考察	87
5 小括	89
結 論	90
参考文献	93
謝 辞	103

略号表

HMG-CoA	: 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA
ACAT	: アシル CoA : コレステロールアシルトランスフェラーゼ
LCAT	: レシチン : コレステロールアシルトランスフェラーゼ
VLDL	: 超低比重リポタンパク質
LDL	: 低比重リポタンパク質
HDL	: 高比重リポタンパク質
aCEase	: 酸性コレステロールエステラーゼ
nCEase	: 中性コレステロールエステラーゼ
Ox-LDL	: 酸化低比重リポタンパク質
Ac-LDL	: アセチル化低比重リポタンパク質
PMA	: フォルボール 12-ミリステート 13-酢酸 (フォルボールエステル)
TG	: トリグリセリド
PL	: リン脂質
AGAT	: アシル CoA : sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ
FBS	: ウシ胎児血清
BSA	: ウシ血清アルブミン
DMSO	: ジメチルスルホキシド
SD	: Sprague-Dawley
JW	: 日本白色種
MEM 培地	: イーグル最少必須培地
DMEM 培地	: ダルベッコ改変イーグル培地
HBSS	: ハンクス緩衝塩溶液
PBS(-)	: Ca・Mg 不含ダルベッコ改変リン酸緩衝塩溶液
NEAA	: 非必須アミノ酸
Pyr	: ピルビン酸
2-ME	: 2-メルカプトエタノール
β -NADP	: 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
DTT	: ジチオトレイトール
HPBCD	: ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
IC ₅₀	: 50%抑制濃度
ED ₅₀	: 50%有効用量
Ki	: 阻害定数

緒 論

コレステロールは脊椎動物に見いだされる代表的なステロールであり、細胞の膜成分やステロイドホルモンの材料となる生命機能維持に不可欠な脂質である。コレステロールは主として肝臓における生合成または小腸からの食餌性コレステロールの吸収により供給される。合成または吸収されたコレステロールは血液中のリポタンパク質を介して他の組織に輸送される。一方、生体内のコレステロールはそのステロイド骨格の3位に水酸基を持つ遊離型と、この水酸基を長鎖脂肪酸に置換したエステル型の2種類がある。遊離コレステロールは極性脂質であり、リン脂質とともに生体膜の構成成分となっている。一方、コレステロールエステルは非極性脂質（中性脂質）であり、細胞内でのコレステロールの貯蔵およびリポタンパク質の構成成分としてコレステロールの輸送に使われる。極性脂質である遊離コレステロールの過剰は生体膜流動性の変化等を引き起こすため生体に有害である(1)。コレステロールのエステル化はこれを回避するためのいわゆるコレステロール恒常性機能と考えられる。細胞内における遊離コレステロールからコレステロールエステルへの転換反応はアシル CoA : コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT, EC 2.3.1.26) により触媒される (Fig. 1) (2)。

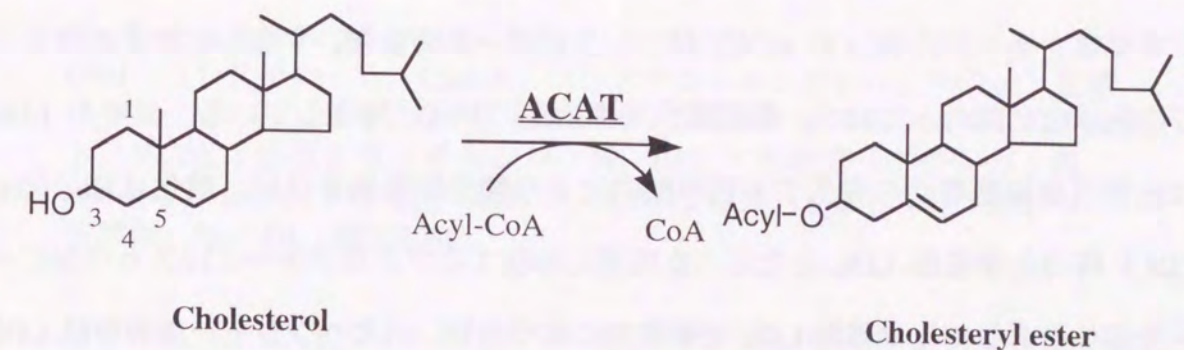


Fig. 1 Enzymatic reaction of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT).

ACAT は肝臓、小腸粘膜、ステロイド産生細胞（副腎皮質等）およびマクロファージ等の粗面小胞体に存在することが知られており、各組織におけるコレステロール代謝において重要な役割を果たしている（Fig. 2）（2）。

小腸において ACAT は食餌性コレステロールの吸収に関与している。食餌性コレステロールは遊離コレステロールとして小腸粘膜細胞に吸収された後、ACAT によりエステル化され、リポタンパク質の一種であるカイロミクロンに組み込まれる。カイロミクロンはリンパ管へ分泌され、その結果、食餌性コレステロールは体内に吸収される。カイロミクロンはリンパ管から静脈へ移行した後、カイロミクロンレムナントに代謝され、レムナント受容体を介して肝臓に取り込まれる（2）。

肝臓はコレステロール代謝の中核組織であり、肝臓における ACAT は超低比重リポタンパク質（VLDL）の形成・分泌に関与していると考えられている。肝臓には小腸ならびに血中の低比重リポタンパク質（LDL）等のリポタンパク質由来の外因性コレステロール供給の他、内因性のコレステロール合成による供給経路も存在する。これら内因性または外因性のコレステロールは肝臓の ACAT によりエステル化され VLDL に組み込まれた後、血中に分泌される（2）。VLDL は血中で段階的に LDL に代謝される。LDL は LDL 受容体を介して末梢組織にコレステロールを供給する。

副腎皮質等のステロイド産生細胞では LDL 由来のコレステロールが ACAT によってエステル化され、ステロイドホルモン合成原料として細胞内に貯蔵される（2，3）。

マクロファージにおいて ACAT はコレステロールの蓄積、すなわちマクロファージの泡沫化に関わっており、動脈硬化初期病変の形成に関与している。血中の LDL は血管内皮細胞等から発生する活性酸素により酸化的修飾を受け、酸化 LDL（Ox-LDL）等の化学修飾 LDL となる。血管壁に存在するマクロファージはスカベンジャー受容体を介して化学修飾 LDL を細胞内に取り込む。スカベンジャー受容体は LDL 受容体と異なってダウンレギュレーションを受けないため、化学修飾 LDL は際限なくマクロファージに取り込まれる。取り込まれた化学修飾 LDL のコレステロールエ

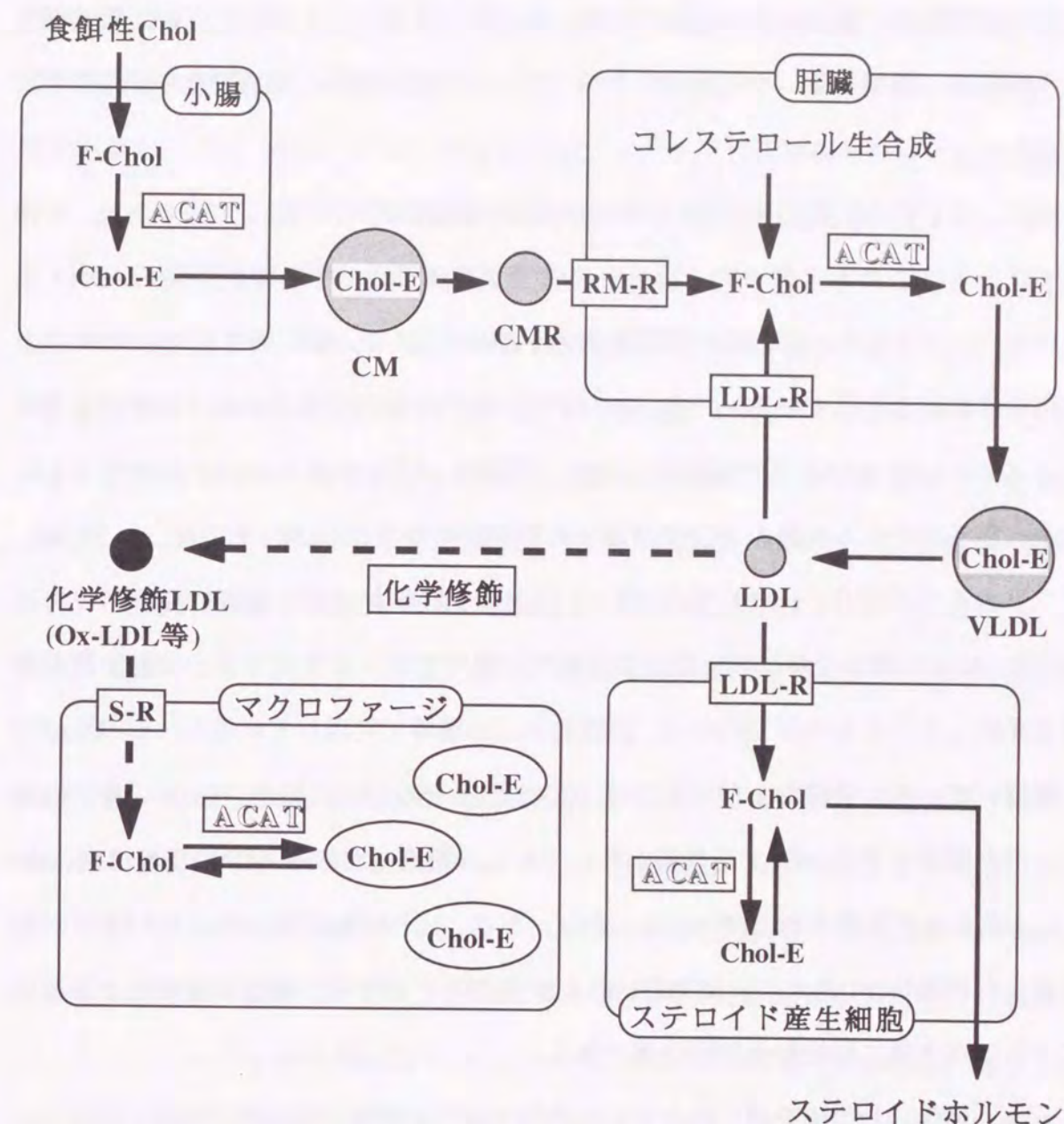


Fig. 2 生体内におけるACATの役割

Chol：コレステロール，Chol-E：コレステロールエステル，F-Chol：遊離コレステロール，CM：カイロミクロン，CMR：カイロミクロンレムナント，VLDL：超低比重リポタンパク質，LDL：低比重リポタンパク質，RM-R：レムナント受容体，LDL-R：LDL受容体，S-R：スカベンジャー受容体，Ox-LDL：酸化LDL。

ステルは細胞内で脱エステル化された後、ACATにより再エステル化され、脂肪滴として細胞質に蓄積する。その結果マクロファージは泡沫化し、動脈硬化病変を形成する(2)。

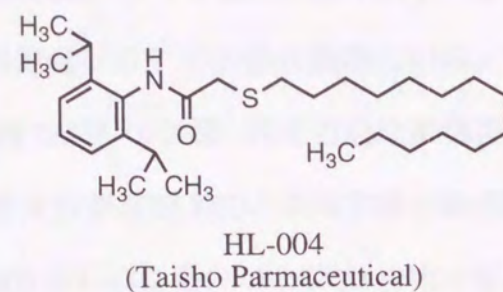
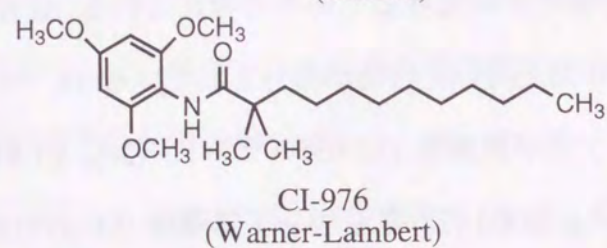
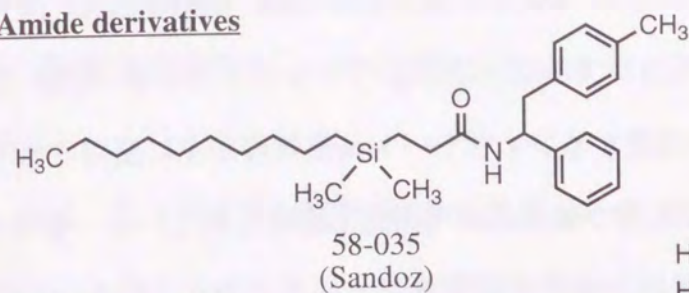
最近、ヒト白血病細胞株 THP-1 から ACAT 遺伝子がクローニングされ(4)、その後、マウス(5)、ハムスター(6)、ラット(7)の全長およびウサギの部分長(8)の cDNA もクローニングされた。これらの実験動物の ACAT はアミノ酸配列でヒトと 80%以上の相同性が認められている。一方、ACAT ノックアウトマウスにおいて副腎およびマクロファージの ACAT 活性は消失したが、肝臓ならびに小腸の ACAT 活性は変化しなかったことから、複数の ACAT 遺伝子の存在が示唆された(9)。その後、ヒト(10)、アフリカミドリザル(11)およびマウス(12)において肝臓および小腸等で発現している新たな ACAT 遺伝子がクローニングされた。現在では、マクロファージおよび副腎等で発現しているものが ACAT-1、肝臓および小腸等で発現しているものが ACAT-2 と呼ばれている。肝臓および小腸では ACAT-1 も発現しているが、mRNA 量と組織タンパク質当たりの ACAT 活性等から、これらの組織における ACAT 活性は ACAT-2 によることが推察される(10~13)。その一方で、ヒト肝臓に関しては ACAT-1 が主であるとの報告(14)もあり、ACAT-1 および ACAT-2 の発現・機能の組織による違いについては今後の詳細な検討が必要である。

一方、近年、わが国をはじめとする先進国では心筋梗塞や脳血管梗塞等の虚血性疾患による死亡率が増加し、その治療は医療において重要な分野となっている(15)。高脂血症は虚血性疾患の原因の一つである動脈硬化症と密接に関与しており、最も重要な危険因子である。とりわけ高コレステロール血症は多くの疫学調査から動脈硬化性疾患の独立した危険因子とされている(16)。高脂血症では血中に LDL が長く滞留し、血管内皮細胞等に由来する活性酸素により酸化を受ける機会が多くなる。その結果、発生した多量の化学修飾 LDL を血管壁のマクロファージが取り込むため、動脈硬化症を発症しやすくなる(17)。現在、高脂血症治療薬としてプラバスタチン等のコレス

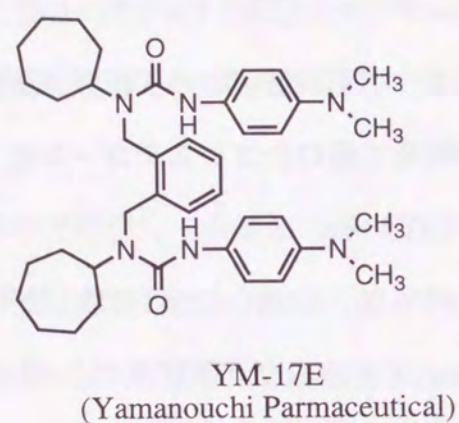
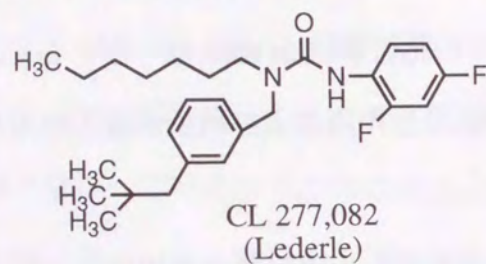
テロール合成を阻害する 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬、ならびに肝臓におけるコレステロールおよびトリグリセリド (TG) 合成を阻害し、また VLDL の異化を促進するフィブラート系薬剤等が主に使用されている。その一方で、新しい作用機序を持つ薬剤の研究開発も進められている。その中で、最近、高脂血症だけでなく動脈硬化症に直接関与していると考えられる ACAT の阻害薬が注目され、多くの ACAT 阻害作用を持つ化合物が報告されている(18, 19)。現在知られている ACAT 阻害薬は大きくアミド誘導体 (58-035 (サンド) (20), CI-976 (ワーナー・ランバート) (21), HL-004 (大正製薬) (22)等)、ウレア誘導体 (CL 277,082 (レダリー) (23), YM-17E (山之内製薬) (24)等) およびイミダゾール誘導体 (E5324 (エーザイ) (25)等) の 3 種類に分類される。これらの化合物は *in vitro* ならびに *in vivo* 実験系で優れたコレステロール低下作用、動脈硬化抑制作用および抗動脈硬化作用を有している。

1996 年、山田ら(26)は合成した一連の新規シクロヘキシルウレア誘導体について *in vitro* におけるウサギ肝臓ミクロソーム ACAT 阻害作用 (50%抑制濃度 (IC_{50})) およびコレステロール負荷ラットにおけるコレステロール低下作用 (血清コレステロール低下率) を検討した。モノウレア体に比べ、ジウレア体は ACAT 阻害活性が強力であった。ジウレア骨格の置換基 R_1 については分岐アルキル基 (NTE-127) 等と比較して炭素 5 以上の環状アルキル基 (C5: NTE-124, C6: NTE-122, C7: NTE-102) が強力な ACAT 阻害作用および血清コレステロール低下作用を示した。置換基 R_2 は 4 位アミノ基を有するフェニル化合物 (NTE-102, NTE-122, NTE-124 等) がより有効であった (Table 1)。ジウレアの結合様式による活性はシクロヘキサン環に対して 1,4-trans > 1,4-cis > 1,3-trans > 1,2-trans の順に有効性を示した。中でも 1,4-trans ジウレア体である *trans*-1,4-bis{[1-cyclohexyl-3-(4-dimethylaminophenyl)ureido]methyl}cyclohexane (NTE-122; Fig. 4) が ACAT 阻害活性および血清コレステロール低下作用において優れた特性を有していた(26)。

Amide derivatives



Urea derivatives



Imidazole derivatives

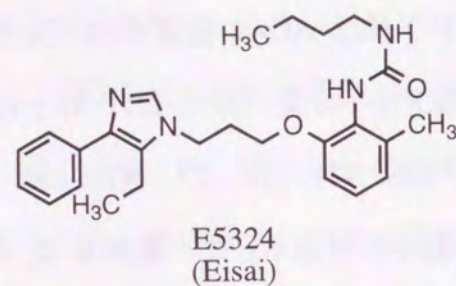


Fig. 3 Chemical structures of some known ACAT inhibitors.

Table 1 Effects of NTE compounds on microsomal ACAT activity in rabbit liver and serum cholesterol level in cholesterol-fed rats

No.	R ₁	R ₂	IC ₅₀ on <i>in vitro</i> ACAT activity (×10 ⁻⁹ M)	Serum cholesterol-lowering (%) *
NTE-102			38	65.9
NTE-105			19	3.3
NTE-122			36	96.9
NTE-124			47	64.7
NTE-127			100	22.4
NTE-157			180	80.9
NTE-165			100 - 1000	0.0

* Doses were 1 mg/kg (NTE-102, 122, 124, 127, 157) or 3 mg/kg (NTE-105, 165).

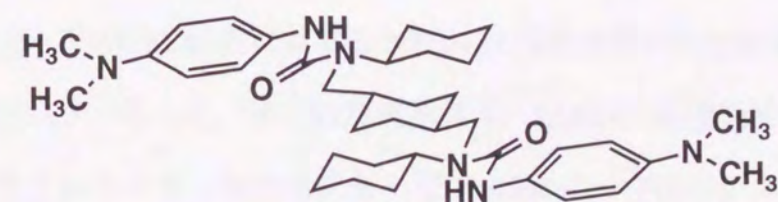


Fig. 4 Chemical structure of NTE-122.

本研究において、著者は NTE-122 の詳細な薬理学的特性（コレステロール低下作用、抗動脈硬化作用）を解明することを目的として、NTE-122 による無細胞系および培養細胞系における ACAT 阻害作用と酵素阻害作用の特異性、ACAT 阻害作用による肝臓、小腸およびマクロファージのコレステロール代謝の変化ならびにコレステロール負荷動物（ラット、ウサギ）におけるコレステロール低下作用を検討した。本論文では、研究内容を 5 章に分けて記述した。

第 1 章では、NTE-122 の無細胞系、培養細胞系におけるヒトおよび実験動物（マウス、ラット、ウサギ）由来 ACAT に対する阻害作用ならびにその阻害様式、酵素阻害作用の特異性を検討した。

第 2 章では、ヒト肝癌細胞 HepG2 を用いて、NTE-122 の肝細胞におけるアポリポタンパク B 含有リポタンパク質および胆汁酸分泌に対する作用を検討した。

第 3 章では、メンブレンフィルター上に培養したヒト結腸癌細胞 CaCo-2 を用いて、NTE-122 の小腸粘膜における脂質吸収に対する作用を検討した。

第 4 章では、フォルボールエステル（PMA）処理ヒト単球性白血病細胞 THP-1 を用いて、NTE-122 のマクロファージの泡沫化および高比重リポタンパク質（HDL）誘導脱泡沫化に及ぼす作用を検討した。

第 5 章では、コレステロール負荷ラットおよびウサギを用いて、NTE-122 の *in vivo* におけるコレステロール低下作用を検討した。

第 1 章 ACAT 阻害作用と他の脂質代謝酵素活性に対する作用

1. 緒言

最近、ACAT において ACAT-1 および ACAT-2 の 2 種類のアイソザイムが確認された。ACAT-1 はマクロファージ、副腎皮質等の組織で発現・機能しており、ACAT-2 は肝臓および小腸におけるコレステロールのエステル化に寄与していることが示唆されている(10~12)。また、ヒト(4)とマウス(5)、ハムスター(6)ならびにラット(7)の ACAT-1 cDNA 配列の比較から、それらのアミノ酸配列がヒトと他のほ乳類の間で 80% 以上相同であるが、相違部分の多くがアミノ末端側に局在することが認められている。しかし、これ以外の種差に関する知見は乏しい。本章では、まず *in vitro* における新規 ACAT 阻害薬 NTE-122 の ACAT 阻害作用について、種および組織・細胞（ACAT アイソザイム）における感受性の差異をヒト培養細胞（ヒト肝細胞癌株 HepG2、ヒト結腸癌株 CaCo-2、ヒトマクロファージ系培養細胞 PMA 処理 THP-1）、ウサギ組織（肝臓、小腸、大動脈）、ラット組織（肝臓、小腸）、マウス組織（肝臓）ならびにマウス培養細胞（マクロファージ細胞株 J774.1）から調製したミクロソームを用いて検討し、他の ACAT 阻害薬、E5324 ならびに CI-976 と比較した。また、HepG2 細胞、CaCo-2 細胞、PMA 処理 THP-1 細胞、ラット腹腔マクロファージおよび J774.1 細胞の培養系に NTE-122 を加え、細胞コレステロールエステル化活性を指標として細胞 ACAT 活性に対する阻害作用を検討した。次に、HepG2 細胞および PMA 処理 THP-1 細胞のミクロソーム ACAT 活性に対する NTE-122 の阻害様式を Lineweaver-Burk プロットにより検討した。さらに、他の脂質代謝酵素、HMG-CoA 還元酵素、アシル CoA 合成酵素、酸性コレステロールエステラーゼ（aCEase）、中性コレステロールエステラーゼ（nCEase）、レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）、アシル CoA：sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ（AGAT）ならびにコレステロール 7 α -水酸化酵素に対する NTE-122 の作用を検討した。また、HepG2

細胞を用いて細胞レベルでの TG, リン脂質 (PL) およびコレステロール生合成に対する NTE-122 の作用についても検討した。

2. 実験材料ならびに実験方法

2. 1. 使用薬物

NTE-122, E5324 (25)および CI-976 (21)は日清食品 (株) 中央研究所において合成されたものを使用した。[1-¹⁴C]オレオイル CoA (2.00~2.22 GBq/mmol), コレステリル [1-¹⁴C]オレイン酸 (2.07 GBq/mmol), [9,10(n)-³H]オレイン酸 (370 GBq/mmol), 3-ヒドロキシ-3-メチル [3-¹⁴C]グルタリル CoA ([3-¹⁴C]HMG-CoA; 2.22 GBq/nmol) ならびに[1-¹⁴C]酢酸ナトリウム (2.11 GBq/mmol)は Amersham 社製のものを使用した。[1,2-³H(N)]コレステロール (1720.5 GBq/nmol), L- [¹⁴C(U)]-グリセロール 3-リン酸 (5.7 GBq/mmol) および [1-¹⁴C]パルミチン酸 (0.31 GBq/mmol) は New England Nuclear 社製のものを用了。リポタンパク質除去ウシ血清 (LPDS) およびアセチル化 (Ac-) LDL は Biomedical Technology 社製のものを, ウシ胎児血清 (FBS) は Filtron 社製または PAA Laboratories 社製のものを使用した。イーグル最少必須 (MEM) 培地, ダルベッコ改変イーグル (DMEM) 培地, RPMI 1640 培地, 199 培地, ハンクス緩衝塩溶液 (HBSS), Ca・Mg 不含ダルベッコ改変リン酸緩衝塩溶液 (PBS(-)), ペニシリン, ストレプトマイシン, 非必須アミノ酸 (NEAA) ならびにピルビン酸 (Pyr) は Gibco BRL 社製のものを, Brij96 は Sigma 社製のものを用了。フォルボール 12-ミリステート 13-酢酸 (PMA) はナカライテスク社製のものを, アクアゾル 2 およびピコアクアは Packard 社製のものを使用した。他の試薬は全て市販の特級試薬を使用した。

2. 2. 実験動物および飼育条件

雄性 ICR 系マウスおよび雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラットは日本チャールス・

リバー社 (東京) より, 雄性日本白色種 (JW) ウサギは北山ラベス社 (長野) より購入した。動物は室温 23.5±2℃, 湿度 55±10%および 12 時間明 (8~20 時): 12 時間暗 (20~8 時) の条件下で飼育し, マウスおよびラットの場合は通常飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母社製)を自由摂取させ, ウサギの場合は通常飼料 RC-4 (オリエンタル酵母社製) を 1 日 100 g 与えて予備飼育した後, 実験に使用した。

2. 3. 使用細胞株および培養条件

ヒト肝細胞癌株 HepG2, ヒト結腸癌株 CaCo-2 ならびにヒト単球性白血病細胞株 THP-1 は大日本製薬より購入した。HepG2 細胞は 10% FBS, 50 units/ml ペニシリン, 50 μg/ml ストレプトマイシン, 1% NEAA および 1 mM Pyr 添加 MEM 培地 (以下, 10% FBS 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地と記す。) 中で継代維持した。CaCo-2 細胞は 10% FBS, 50 units/ml ペニシリン, 50 μg/ml ストレプトマイシンおよび 1% NEAA 添加 DMEM 培地 (以下, 10% FBS 添加 DMEM/NEAA 培地と記す。) 中で継代維持した。THP-1 細胞は 10% FBS, 50 units/ml ペニシリン, 50 μg/ml ストレプトマイシンおよび 1 mM 2-メルカプトエタノール (2-ME) 添加 RPMI 1640 培地 (以下, 10% FBS 添加 RPMI 1640/2-ME 培地と記す。) 中で継代維持した。THP-1 細胞を接着させ, マクロファージへ分化させる場合は, THP-1 細胞を 400 ng/ml PMA を含む培地に 1×10⁶ 個/ml の濃度で播種し, 3 日間培養した。マウスマクロファージ細胞株 J774.1 は理研細胞銀行 (筑波) より分与されたものを使用し, 10% FBS, 50 units/ml ペニシリンおよび 50 μg/ml ストレプトマイシン添加 DMEM 培地 (以下, 10% FBS 添加 DMEM 培地と記す。) 中で継代維持した。これらの細胞の培養は 37℃, 飽和湿度および 5% CO₂ の条件下で行った。

2. 4. ACAT 活性測定

2. 4. 1. ミクロソーム調製

動物組織（マウス，ラットおよびウサギ肝臓，ラットおよびウサギ小腸粘膜，ウサギ大動脈）由来ミクロソームは以下の方法で調製した．雄性 JW ウサギ（2.0～2.5 kg）は 1% コレステロール添加 RC-4 で，肝臓および小腸粘膜調製の場合は 8 週間，大動脈調製の場合は 18 週間飼育した．雄性 ICR 系マウス（20～25 g）ならびに雄性 SD 系ラット（200～250 g）は 1% コレステロール，0.5% コール酸および 5% オリーブ油添加 CRF-1 で 2 週間飼育した．各動物を 24 時間絶食した後，マウスおよびラットはエーテル麻酔下で，ウサギはペントバルビタール（30 mg/kg, i.v.）麻酔下で放血致死させ，肝臓，小腸，大動脈の各組織を摘出した．小腸ならびに大動脈は 0.9% NaCl で洗浄後，各々小腸粘膜，大動脈内膜を剥離した．これらを 0.154 M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）中で破碎し，1,000×g，4℃で 15 分間遠心分離した．上清を 12,000×g，4℃で 15 分間遠心分離後，上清をさらに 105,000×g，4℃で 1 時間遠心分離した．沈殿として得られたミクロソームを 0.154 M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）に懸濁した．

培養細胞（HepG2 細胞，CaCo-2 細胞，PMA 処理 THP-1 細胞，J774.1 細胞）由来ミクロソームの調製法は以下の通りである．HepG2 細胞は 5 μg/ml 25-ヒドロキシコレステロールで 5 時間，CaCo-2 細胞は 5 μg/ml 25-ヒドロキシコレステロールおよび 10 μg/ml コレステロールで 5 時間処理した．PMA 処理 THP-1 細胞は 20 μg/ml Ac-LDL を含む 5% LPDS 添加 RPMI 1640/2-ME 培地中で 6 日間，J774.1 細胞は 50 μg/ml Ac-LDL を含む 5% LPDS 添加 DMEM 培地中で 3 日間培養した．これらの細胞を PBS(-)，次いで低調液（0.04 M KH_2PO_4 ，0.05 M KCl，0.03 M EDTA（pH 7.2））で洗浄した後，低調液中で破碎した．各細胞破碎液を 1,000×g，4℃で 5 分間遠心分離後，上清を 9,000×g，4℃で 10 分間遠心分離し，得られた上清をさらに 105,000×g，4℃で 1 時間遠心分離した．沈殿として得られたミクロソームをしょ糖緩衝液（0.25 M しょ糖，0.04 M

KH_2PO_4 ，0.05 M KCl，0.03 M EDTA（pH 7.2））に懸濁した．

ミクロソーム画分は，Lowry らの方法(27)に従ってタンパク質濃度をウシ血清アルブミン（BSA）を標準タンパク質として測定後，使用するまで-80℃で凍結保存した．

2. 4. 2. ACAT 活性測定

Heider らの方法(28)に準じて行った．20 μM BAS（脂肪酸不含），10～100 μg/ml ミクロソームおよび各濃度の被験物質のジメチルスルホキシド（DMSO）溶液（最終 DMSO 濃度 1%）を含む 0.154 M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）より成る反応液 450 μl を 37℃で 5 分間インキュベートした．反応液に 36 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]オレオイル CoA 50 μl を添加し，さらに実験動物組織由来ミクロソームおよび J774.1 ミクロソームの場合は 5 分間，その他の場合は 10 分間インキュベートした．反応液にコレステリルオレイン酸 80 μg を含むクロロホルム：メタノール（2:1，v/v）混液 5.2 ml を添加して反応を停止し，クロロホルム層を超純水，次いで 0.9% NaCl で洗浄した．クロロホルム層を窒素気流下 60℃で蒸発乾固した後，脂質を n-ヘキサンまたはトルエン 40 μl に溶解，薄層クロマト板（TLC aluminum sheets 20 × 20 cm Silica gel 60；Merck 社製）に塗布し，n-ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸（80:20:1，v/v/v）混液にて展開した．薄層クロマト板を 2% ヨウ素の噴霧により呈色した後，コレステロールエステルの領域を切り抜き，放射活性を液体シンチレーションカウンター（LC 1801；Beckman 社製または TRI-CARB 2700TR；Packard 社製）で測定した．液体シンチレーターはアクアゾル 2 を使用した．

阻害様式は各濃度のオレオイル CoA に対する Lineweaver-Burk プロットにより解析し，阻害定数（ K_i ）を Dixon プロットにより求めた．

2. 5. ラット腹腔マクロファージの調製

興の方法(29)に準じて行った．雄性 SD 系ラット（250～280 g）を断頭屠殺した後，

37℃のヘパリン 10 units/ml 添加 HBSS 20 ml を腹腔内に注入し、腹壁を2分間マッサージした。その後、開腹して腹腔内液を回収し、250×g、4℃で10分間遠心分離した。得られた細胞をHBSSで洗浄した後、10% FBS、50 units/ml ペニシリンおよび50 μg/ml ストレプトマイシン添加 RPMI 1640 培地（以下、10% FBS 添加 RPMI 1640 培地と記す。）に浮遊させた。培養用 12 well plate に細胞を 3×10⁶ 個/well 播種し、10% FBS 添加 RPMI 1640 培地 1 ml 中で1時間、37℃、5% CO₂ 飽和湿度下で培養した後、PBS(-)で3回洗浄し、付着細胞としてラット腹腔マクロファージを得た。培地を 5% LPDS 添加 RPMI 1640 培地に交換し、18時間培養した後、実験に供した。

2. 6. 細胞コレステロールエステル化活性（細胞 ACAT 活性）測定

HepG2 の場合は Salisbury らの方法(30)に準じて行った。HepG2 細胞を培養用 12 well plate に 1×10⁶ 個/well 播種し、10% FBS 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地 1 ml 中で2日間培養した。培地を 5% LPDS 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地に交換し、さらに18時間培養した。細胞を PBS(-)で洗浄した後、25-ヒドロキシコレステロール 5 μg/ml を含む 5% LPDS 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地 0.9 ml を well に加え 2.5 時間培養した。

CaCo-2 の場合は Field らの方法(31)に準じて行った。CaCo-2 細胞を培養用 12 well plate に 5×10⁵ 個/well 播種し、10% FBS 添加 DMEM/NEAA 培地 1 ml 中で10日間培養した。細胞を PBS(-)で洗浄した後、0.2 mM コレステロール、5 mM タウロコール酸ナトリウムおよび 0.05 mM L-α-フォスファチジルコリンを含む 1 mM HEPES 添加 199 培地 0.9 ml を well に加え 2.5 時間培養した。

PMA 処理 THP-1、ラット腹腔マクロファージおよび J774.1 の場合は Kogushi らの方法(25)に準じて行った。THP-1 細胞は培養用 12 well plate に 1×10⁶ 個/well 播種し、上記の方法で PMA 400 ng/ml とともに3日間処理することによりマクロファージ化した。PMA 処理 THP-1 細胞を PBS(-)で3回洗浄した後、5% LPDS 添加 RPMI 1640/2-ME 培地中で18時間培養した。細胞を PBS(-)で洗浄した後、Ac-LDL 50 μg/ml を含

む上記培地 0.9 ml を well に加え 5 時間培養した。ラット腹腔マクロファージは上記の方法で調製後、Ac-LDL 50 μg/ml を含む 5% LPDS 添加 RPMI 1640 培地 0.9 ml を well に加え 5 時間培養した。J774.1 細胞は培養用 12 well plate に 1×10⁶ 個/well 播種し、10% FBS 添加 DMEM 培地 1 ml 中で24時間培養した後、培地を 5% LPDS 添加 DMEM 培地に交換し、さらに18時間培養した。細胞を PBS(-)で洗浄した後、Ac-LDL 50 μg/ml を含む上記培地 0.9 ml を well に加え 5 時間培養した。

これらの培養系に 1% DMSO 含有培地に溶解した被験物質溶液 0.1 ml を well に加え、30分間培養した。その後、5 mM [³H]オレイン酸-12% BSA (296 MBq/mmol of oleate) 20 μl を well に加え、さらに2時間培養した。各細胞を 0.2% BSA/PBS(-)で2回、次いで PBS(-)で1回洗浄した後、n-ヘキサン：イソプロピルアルコール (3:2, v/v) 混液 0.5 ml を加え、室温で15分間放置して脂質を抽出した。抽出操作を2回行った後、抽出液にトリオレイン、コレステリルオレイン酸および L-α-フォスファチジルコリンを各々 50 μg 加え蒸発乾固した。n-ヘキサン 40 μl を添加して脂質を溶解し、ACAT 活性測定の場合と同様、薄層クロマト法でコレステロールエステル、TG ならびに PL を分離し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。液体シンチレーターはアクアゾル 2 を使用した。比活性 (296 MBq/mmol of oleate) から生成した [³H]コレステロールエステル、[³H]TG および [³H]PL 量を求めた。細胞残渣に 0.1 N NaOH 0.5 ml を加え室温で30分間放置してタンパク質を可溶化後、タンパク質濃度を定量し、[³H]コレステロールエステル、[³H]TG ならびに [³H]PL の生成量を補正した。

2. 7. HMG-CoA 還元酵素活性測定

Kaneko らの方法(32)に準じて行った。HepG2 細胞を 5 mM EDTA および 200 mM KCl を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) と 5% Brij96 の 20:1 (v/v) 混液に懸濁し、37℃で10分間インキュベートした。この懸濁液を 12,000×g、4℃で15分間遠

心分離し、上清として細胞可溶化液を調製、タンパク質濃度を測定した。HepG2 細胞可溶化液タンパク質 0.5 mg/ml, 20 mM D-グルコース-6-リン酸, 2.5 mM 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸 (β -NADP), 0.5 単位/ml グルコース-6-リン酸脱水素酵素, 4 mM ジチオトレイトール (DTT) および被験物質の DMSO 溶液 (最終 DMSO 濃度 1%) を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) より成る反応液を調製し, 37°C で 5 分間インキュベートした。30 μ M [3 - 14 C]HMG-CoA を 10 μ l 添加し, 全量を 100 μ l としてさらに 1 時間インキュベートした。2 N HCl を 20 μ l 添加して反応を停止し, さらに 37°C で 15 分間インキュベートした後, メバロノラクトン 160 μ g を添加した。反応液の 40 μ l を薄層クロマト板 (TLC plastic sheets 20 \times 20 cm Silica gel 60 F254 plastic sheets ; Merck 社製) に塗布し, ベンゼン : アセトン (1:1, v/v) 混液で展開した後, 分離したメバロノラクトンの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。液体シンチレーターはピコアクアを使用した。

2. 8. アシル CoA 合成酵素活性測定

Banis らの方法(33)に従って行った。5.3 mM $MgCl_2$, 22.2 mM ATP, 13.3 mM KF, 0.44 mM coenzyme A, 13.3 mM 2-ME, 0.133 mM パルミチン酸カリウム, 3.7 kBq/ml [1 - 14 C]パルミチン酸および被験物質の DMSO 溶液 (最終 DMSO 濃度 1%) を含む 55.6 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) から成る反応液 180 μ l を 37°C で 5 分間インキュベートした後, 上記の方法で調製したウサギ肝臓ミクロソーム 10 mg/ml を 20 μ l 加え反応を開始した。反応液を 37°C で 2 分間インキュベートした後, イソプロパノール : n-ヘプタン : 1 M 硫酸 (40:10:1, v/v/v) 混液 2.25 ml を加えて反応を停止させ, n-ヘプタン 1.5 ml, 超純水 1 ml を順次加えた。水層を 4 mg/ml パルミチン酸カリウムを含む n-ヘプタンで 2 回洗浄後, ピコアクアと混合し, 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

2. 9. aCEase および nCEase 活性測定

Liza らの方法(34)に準じて行った。PMA 処理 THP-1 細胞を 0.25 M しょ糖を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で破碎し, タンパク質濃度を測定した。aCEase 活性測定の場合, 0.25 mM L- α -リゾフォスファチジル-L-セリン, 7.15 μ M コレステリル [1 - 14 C]オレイン酸, 125 μ M コレステリルオレイン酸, 37.5 μ g/ml 細胞破碎液, 7.5 mM ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HPBCD) および被験物質の DMSO 溶液 (最終 DMSO 濃度 1%) を含む 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) から成る反応液 200 μ l を 37°C で 30 分間インキュベートした。nCEase 活性測定の場合, 2.85 μ M コレステリル [1 - 14 C]オレイン酸, 47.15 μ M コレステリルオレイン酸, 0.2 mM L- α -リゾフォスファチジル-L-セリン, 0.25 mg/ml 細胞破碎液, 7.5 mM HPBCD および被験物質の DMSO 溶液 (最終 DMSO 濃度 1%) を含む 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) から成る反応液 200 μ l を 37°C で 30 分間インキュベートした。反応液に Belfrage's 液 (メタノール : クロロホルム : n-ヘプタン = 1.42:1.25:1.00, v/v/v) 3.25 ml を加えて反応を停止し, さらに 0.1 N NaOH 1 ml を加えた後, 1,000 \times g で 20 分間遠心分離した。得られた水層をピコアクアと混合し, 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

2. 10. LCAT 活性測定

Kuroda らの方法(35)に準じて行った。雄性 JW ウサギ (約 3.0 kg) の後耳介動脈より採取した血液にエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加後, 遠心分離により血漿を得, 遊離コレステロール値を遊離コレステロール E-テストワコー (和光純薬製) を用いて測定した。ウサギ血漿 100 μ l, 0.111 kBq [$1,2$ - 3 H(N)]コレステロール, 2.5% BSA および 1 mM 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を含む 0.154 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) よりなる反応液 (最終容量 200 μ l) を調製し, 37°C で 4 時間インキュベートした。100 mM 2-ME 20 μ l および被験物質の DMSO 溶液 2 μ l を添加,

37℃でさらに 40 分間インキュベートした。反応液にコレステリルオレイン酸およびコレステロールを各々 80 μ g 含むクロロホルム：メタノール (2:1, v/v) 混液 5.2 ml を添加して反応を停止させた。クロロホルム層を超純水で洗浄，蒸発乾固した後，ACAT 活性測定の場合と同様の方法で薄層クロマト法にて分離したコレステロールエステルおよび遊離コレステロールの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。液体シンチレーターはアクアゾル 2 を使用した。LCAT 活性 (nmol/ml/hr) は血漿遊離コレステロール値 (mg/ml) \times コレステロールエステルの放射活性 (cpm) \div (遊離コレステロールの放射活性 (cpm) + コレステロールエステルの放射活性 (cpm)) \times 60/40 \times 1000/386.64 (コレステロールの分子量) の式(36)より算出した。

2. 1 1. AGAT 活性測定

Yamashita らの方法(37)に準じて行った。雄性 SD 系ラット (220~250 g) の肝臓を 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 50 mM KCl, 50 mM KF および 300 mM しょ糖を含む 40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で破碎し，20,000 \times g, 4℃で 20 分間遠心分離した。得られた上清をさらに 105,000 \times g, 4℃で 1 時間遠心分離し，沈殿としてミクロソームを得た。このミクロソームを同緩衝液で洗浄，再懸濁した後，タンパク質濃度を測定した。200 μ g/ml ラット肝臓ミクロソーム，10 μ M パルミトイル CoA および被験物質の DMSO 溶液 (最終 DMSO 濃度 1%) を含む 0.154 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を 25℃で 5 分間インキュベートした。10 μ M L- [14 C(U)] -グリセロール 3-リン酸を添加し，反応液量を 200 μ l とし，25℃でさらに 5 分間インキュベートした。反応液に 10 mg/ml グリセロール 3-リン酸のメタノール溶液を 2 ml 加え反応を停止し，次いでクロロホルム 4 ml ならびに 0.2 N 塩酸 1 ml 加えた。クロロホルム層を 50% メタノールおよび 0.1 N 塩酸の混液 4 ml で 3 回洗浄，濃縮後，アクアゾル 2 を加えて液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

2. 1 2. コレステロール 7 α -水酸化酵素活性測定

Kuroda らの方法(35)に準じて行った。雄性 SD 系ラット (220~250 g) を昼夜逆転の条件下 (16~4 時：明) で 10 日間飼育した後，9~10 時の間に AGAT 活性測定の場合と同様の方法で肝臓ミクロソームを調製した。10 μ g/ml ラット肝臓ミクロソームおよび [1,2- 3 H(N)]コレステロール-BSA (37 kBq, 25 pmol-0.5% BSA) を含む 70 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 100 μ l を氷水中で 2 時間インキュベートした後，被験物質の DMSO 溶液 5 μ l を加えて 37℃で 5 分間インキュベートした。1.25 mM β -NADP, 2.5 mM D-グルコース-6-リン酸，10 mM MgCl₂ および 5 単位/ml グルコース-6-リン酸脱水素酵素を含む 70 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を加えて全量を 500 μ l とし，37℃でさらに 10 分間インキュベートした。反応液に 7 α -ヒドロキシコレステロールおよびコレステロールを各々 160 μ g 含むクロロホルム：メタノール (2:1, v/v) 混液 5.2 ml を加えて反応を停止し，クロロホルム層を超純水，次いで 0.9% NaCl で洗浄した。クロロホルム層を蒸発乾固後，n-ヘキサン 40 μ l に溶解，薄層クロマト板 (TLC aluminum sheets 20 \times 20 cm Silica gel 60 ; Merck 社製) にコレステロール，7 α -ヒドロキシコレステロール，7 β -ヒドロキシコレステロールおよび 7-ケトコレステロール，各々 40 μ g とともに塗布し，酢酸エチル：n-ヘキサン (8:2, v/v) 混液にて展開した。7 α -ヒドロキシコレステロールならびにコレステロールの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。液体シンチレーターはアクアゾル 2 を使用した。コレステロール 7 α -水酸化酵素活性はコレステロールから 7 α -ヒドロキシコレステロールへの変換率 (7 α -ヒドロキシコレステロールの放射活性 (dpm) \div (コレステロールの放射活性 (dpm) + 7 α -ヒドロキシコレステロールの放射活性 (dpm))) から算出した。

2. 1 3. コレステロール生合成

Nagata らの方法(38)に準じて行った。HepG2 細胞を培養用 12 well plate に 1 \times 10⁶個

/well を播種し、10% FBS 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地 1 ml 中で 3 日間培養した後、培地を 5% LPDS 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地に交換し、さらに 18 時間培養した。細胞を PBS(-) で洗浄した後、被験物質の DMSO 溶液を含む 5% LPDS 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地 1 ml (最終 DMSO 濃度 0.1%) を well に加え 1 時間培養した。次に、50 mM [2- 14 C]酢酸ナトリウム (263.75 MBq/mmol) 20 μ l を well に加え、さらに 2 時間培養した。細胞コレステロールエステル化活性測定と同様の方法で細胞より脂質を抽出し、コレステロールを 80 μ g 加えた後、薄層クロマト法でコレステロールを分離し液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。液体シンチレーターはアクアゾル 2 を使用した。比活性から生成 [14 C]コレステロール量を求めた。細胞コレステロールエステル化測定の場合と同様の方法で定量した細胞タンパク質量により生成 [14 C]コレステロール量を補正した。

3. 実験結果

3. 1. ミクロソーム ACAT 活性阻害作用

ヒト培養細胞 (HepG2, CaCo-2, PMA 処理 THP-1), ウサギ組織 (肝臓, 小腸, 大動脈), ラット組織 (肝臓, 小腸), およびマウス肝臓および培養細胞 (J774.1) から調製したミクロソーム画分における ACAT 活性に対する NTE-122 の阻害作用を他の ACAT 阻害薬, E5324 ならびに CI-976 と比較検討した。肝臓については, NTE-122 の ACAT 活性阻害作用の IC_{50} 値は $1.8 \sim 4.4 \times 10^{-9}$ M であった。NTE-122 の効力を E5324 と比較した場合, ウサギではほぼ同等であったが, それ以外では 4.9~21 倍強力であった。また, CI-976 と比較した場合, NTE-122 の効力は 3.9~68 倍強力であった (Table 2)。小腸については, NTE-122 の ACAT 活性阻害作用の IC_{50} 値は $1.2 \sim 8.2 \times 10^{-9}$ M であった。NTE-122 の効力は E5324 と比較して, ウサギではほぼ同等であったが, CaCo-2 細胞では 16 倍, ラット小腸では 8.2 倍強力であった。また, NTE-122 の効力を CI-976 と比較した場合, ウサギでは 2.1 倍であったが, CaCo-2 細胞では 30 倍, ラット小腸では 60 倍強力であった (Table 3)。マクロファージ (PMA 処理 THP-1, J774.1) および大動脈 (ウサギ) の場合, PMA 処理 THP-1 における NTE-122 の IC_{50} 値は 8.8×10^{-10} M であり, E5324 の 77 倍, CI-976 の 170 倍の効力を示した。一方, J774.1 細胞における NTE-122 の IC_{50} 値は 3.6×10^{-7} M であり, E5324 および CI-976 とほぼ同程度であった。また, 泡沫細胞を含むウサギ大動脈における NTE-122 の IC_{50} 値は 9.6×10^{-9} M であり, E5324 ならびに CI-976 と比較して各々 7.3 倍, 18 倍の効力を示した (Table 4)。

Table 2 Inhibitory effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on microsomal ACAT activities originating from HepG2 cells and liver from various species

Origin of ACAT	IC ₅₀ (× 10 ⁻⁹ M)		
	NTE-122	E5324	CI-976
Human (HepG2)	1.9	40.0	130
Rat (Liver)	2.2	13.0	130
Mouse (Liver)	1.8	8.8	48
Rabbit (Liver)	4.4	5.8	17

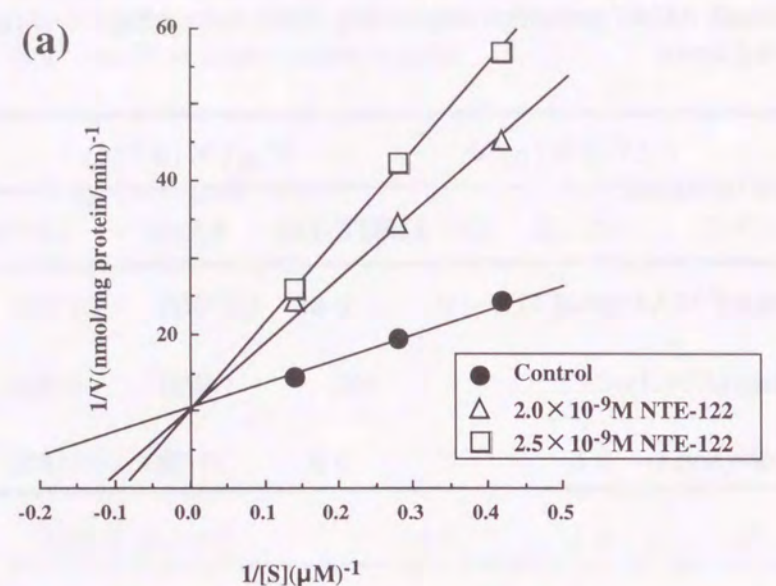
Table 3 Inhibitory effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on microsomal ACAT activities originating from CaCo-2 cells and small intestine from rats and rabbits

Origin of ACAT	IC ₅₀ (× 10 ⁻⁹ M)		
	NTE-122	E5324	CI-976
Human (CaCo-2)	8.2	130.0	250
Rat (Small intestine)	1.2	9.8	72
Rabbit (Small intestine)	7.6	8.0	16

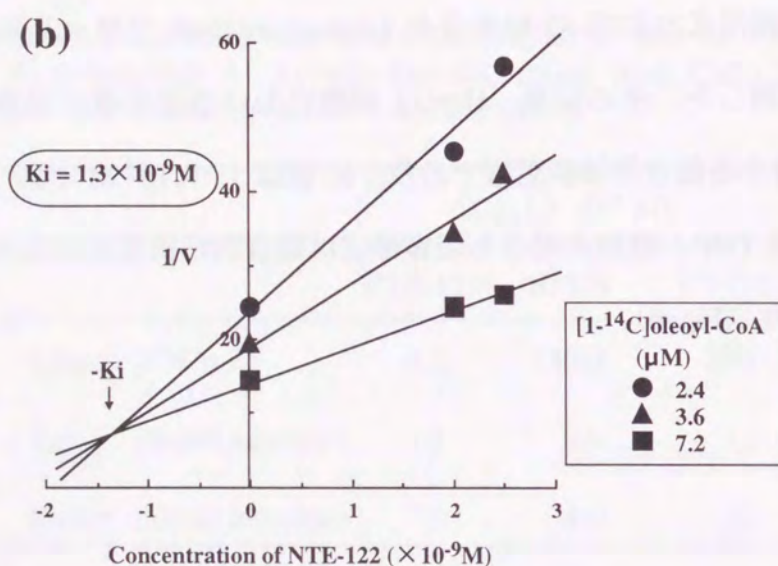
Table 4 Inhibitory effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on microsomal ACAT activities originating from macrophage cell lines and rabbit aorta

Origin of ACAT	IC ₅₀ (× 10 ⁻⁹ M)		
	NTE-122	E5324	CI-976
Human (PMA-treated THP-1)	0.88	68	150
Mouse (J774.1)	360	280	380
Rabbit (aorta)	9.6	70	170

また, NTE-122 の HepG2 細胞および PMA 処理 THP-1 細胞のミクロソーム ACAT 活性に対する阻害様式および Ki 値を各々 Lineweaver-Burk プロットおよび Dixon プロットにより解析した. その結果, HepG2 細胞における阻害様式は基質であるオレオイル CoA に対する競合的拮抗阻害であり, Ki 値は 1.3×10^{-9} M であった (Fig. 5). また, PMA 処理 THP-1 細胞の場合も阻害様式は競合的拮抗阻害であり, Ki 値は 1.6×10^{-9} M であった (Fig. 6).

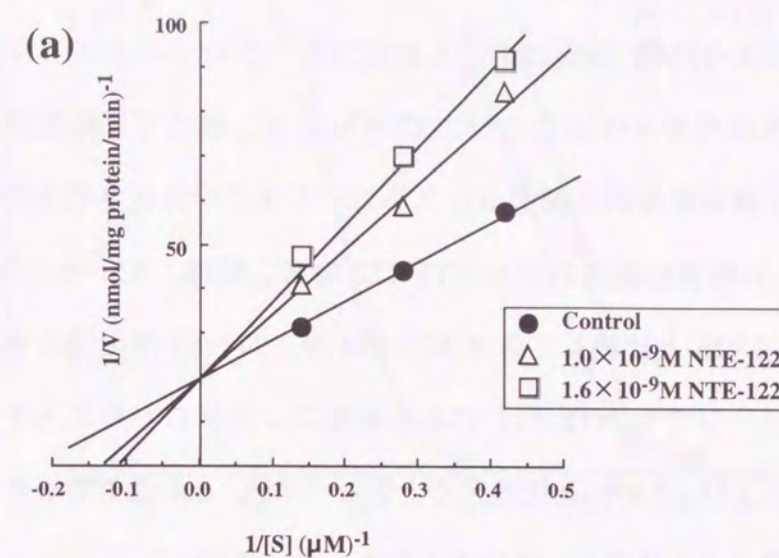


V: nmol cholesteryl [^{14}C]oleate formed/mg microsomal protein/min
[S]: concentration of [^{14}C]oleoyl-CoA (μM)
N = 2 (Mean)

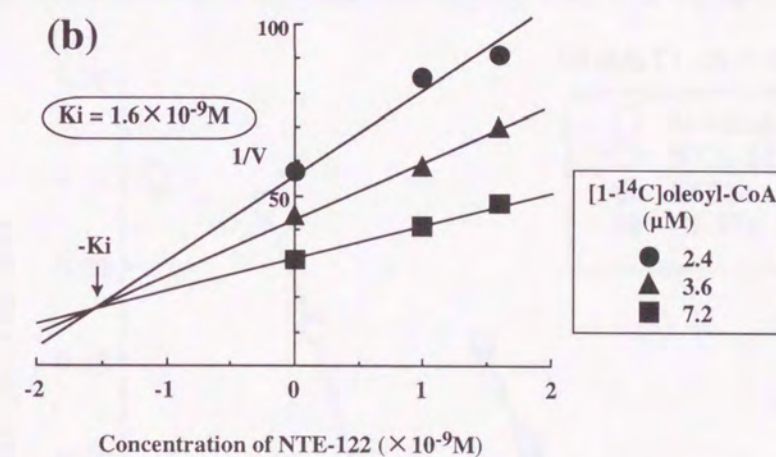


V: nmol cholesteryl [^{14}C]oleate formed/mg microsomal protein/min
N = 2 (Mean)

Fig. 5 Lineweaver-Burk plot (a) and Dixon plot (b) of the inhibition of HepG2 microsomal ACAT activity by NTE-122.



V: nmol cholesteryl [^{14}C]oleate formed/mg microsomal protein/min
[S]: concentration of [^{14}C]oleoyl-CoA (μM)
N = 2 (Mean)



V: nmol cholesteryl [^{14}C]oleate formed/mg microsomal protein/min
N = 2 (Mean)

Fig. 6 Lineweaver-Burk plot (a) and Dixon plot (b) of the inhibition of PMA-treated THP-1 microsomal ACAT activity by NTE-122.

3. 2. 培養細胞におけるコレステロールエステル化活性に対する阻害作用

NTE-122 のヒト培養細胞 (HepG2, CaCo-2, PMA 処理 THP-1), ラット腹腔マクロファージおよびマウス J774.1 細胞における細胞コレステロールエステル化活性 (細胞 ACAT 活性) 阻害作用を E5324 ならびに CI-976 と IC_{50} 値にて比較検討した. これらの化合物はすべて濃度依存的に細胞コレステロールエステル化活性を阻害した (Fig. 7~11). 3 種類のヒト培養細胞における NTE-122 の IC_{50} 値は, $3.5 \sim 6.0 \times 10^{-9}$ M であり, E5324 および CI-976 と比較して各々 47~254 倍, 37~65 倍の効力を示した. ラット腹腔マクロファージでも NTE-122 による細胞コレステロールエステル化活性阻害作用は, E5324 および CI-976 と比較すると各々 13 倍, 6.4 倍であったが, マウスの J774.1 細胞では各々 2.6 分の 1, 14 分の 1 であった (Table 5).

一方, NTE-122 は 1.0×10^{-7} M で HepG2 細胞の細胞コレステロールエステル化活性を 98.7% 阻害した (Fig. 7) が, 同じ濃度で細胞 TG および細胞 PL の合成には有意な阻害作用を示さなかった (Table 6).

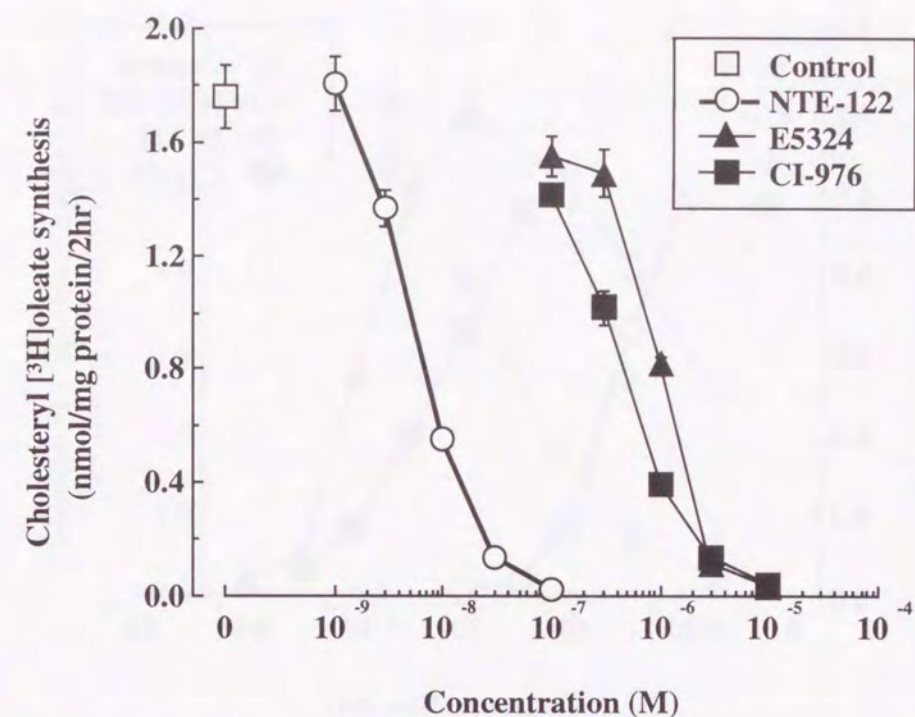


Fig. 7 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on the $[^3H]$ oleate incorporation into cellular cholesteryl esters (whole-cell ACAT activity) in HepG2 cells. Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate assays.

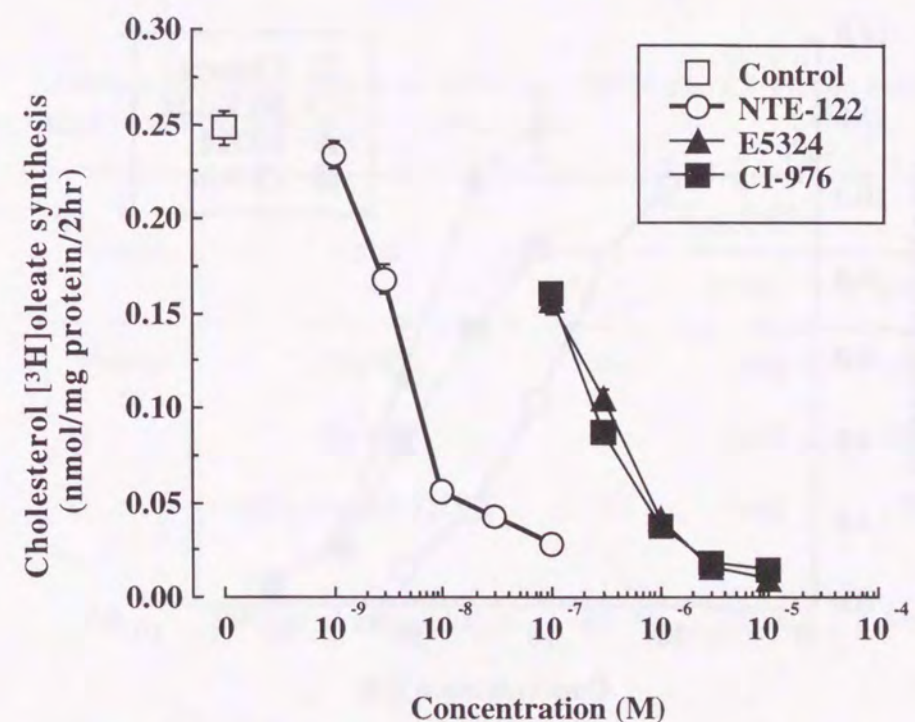


Fig. 8 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on the $[^3H]$ oleate incorporation into cellular cholesteryl esters (whole-cell ACAT activity) in CaCo-2 cells. Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate assays.

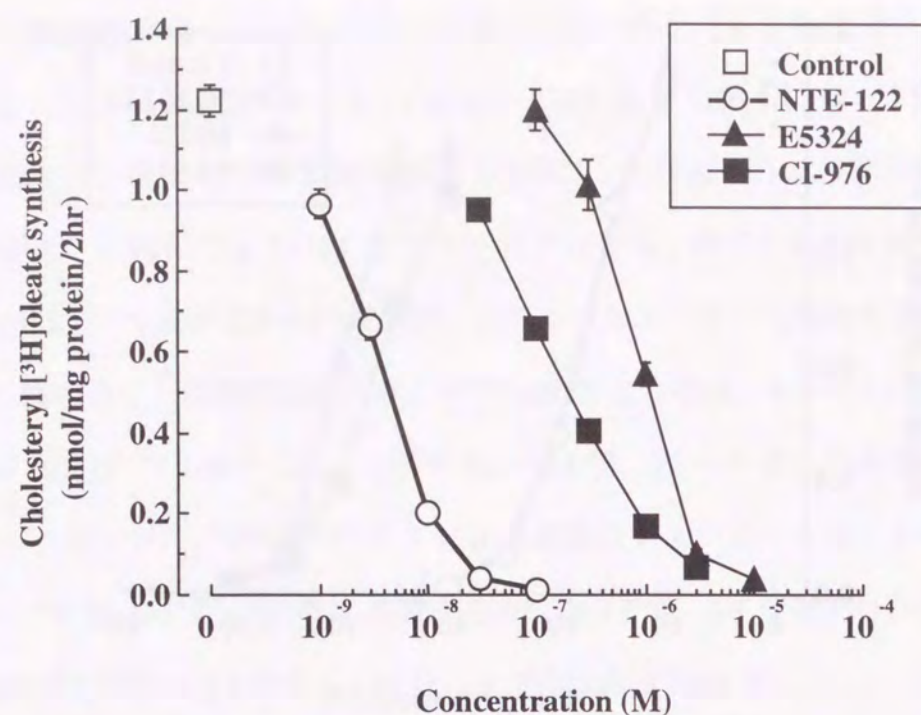


Fig. 9 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on the [^3H]oleate incorporation into cellular cholesteryl esters (whole-cell ACAT activity) in PMA-treated THP-1 cells. Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate assays.

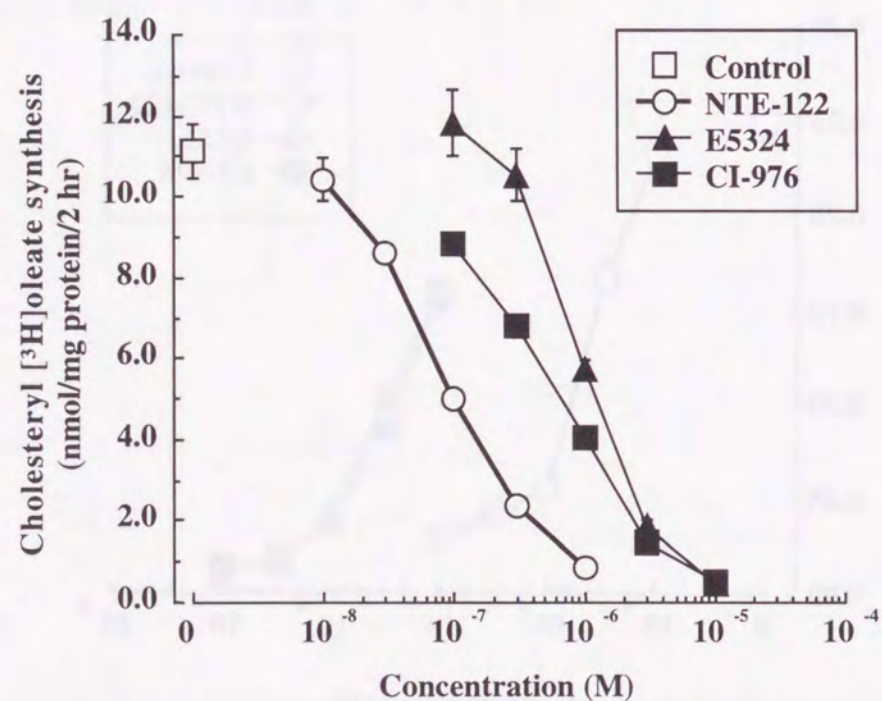


Fig. 10 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on the [^3H]oleate incorporation into cellular cholesteryl esters (whole-cell ACAT activity) in rat peritoneal macrophages. Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate assays.

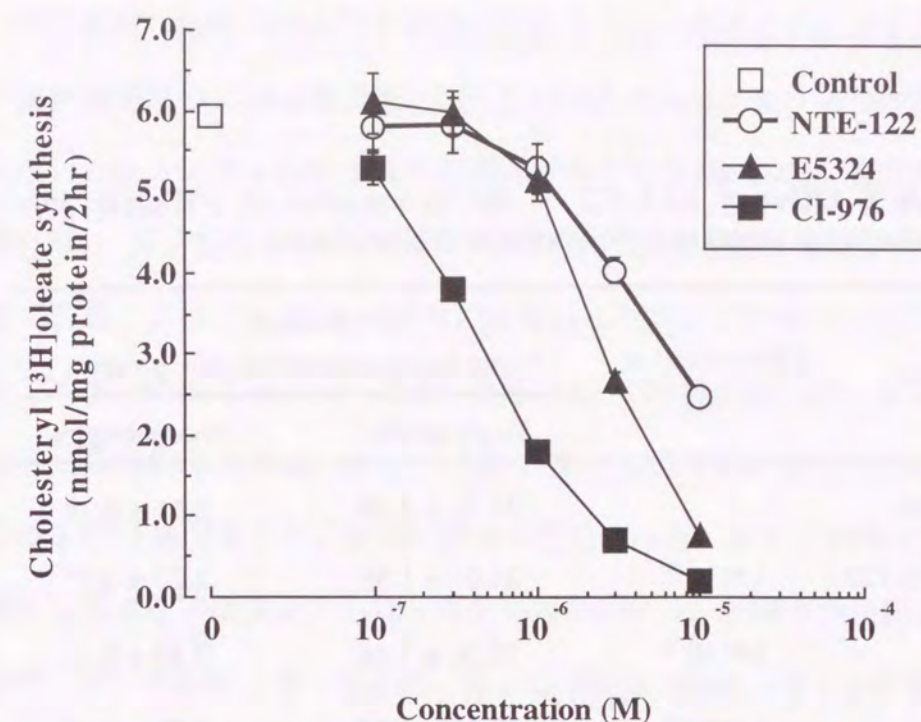


Fig. 11 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on the [^3H]oleate incorporation into cellular cholesteryl esters (whole-cell ACAT activity) in J774.1 cells. Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate assays.

Table 5 Inhibitory effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on cellular cholesterol esterification in various cells

Species	Cells	IC ₅₀ (nM)		
		NTE-122	E5324	CI-976
Human	HepG2	6.0	960	390
	CaCo-2	4.7	220	180
	PMA-treated THP-1	3.5	890	130
Rat	Peritoneal macrophages	84	1100	540
Mouse	J774.1	6800	2600	480

Table 6 Effect of NTE-122 on the incorporation of [³H]oleate into cellular triglycerides and phospholipids in HepG2 cells

Drug	Concentration (M)	Product (nmol incorporation/mg cell protein)	
		Triglycerides	Phospholipids
None		24.70 ± 1.84	2.51 ± 0.39
NTE-122	1 × 10 ⁻⁹	24.07 ± 1.38	2.22 ± 0.27
	3 × 10 ⁻⁹	23.50 ± 1.36	2.39 ± 0.15
	1 × 10 ⁻⁸	24.87 ± 0.35	2.70 ± 0.33
	3 × 10 ⁻⁸	26.56 ± 0.91	3.04 ± 0.33
	1 × 10 ⁻⁷	26.47 ± 0.16	3.08 ± 0.24

Each value represents the mean ± S.E.M. of triplicate assays.

3. 3. 他の脂質代謝酵素および培養細胞コレステロール生合成に対する作用

他の脂質代謝酵素および培養細胞コレステロール生合成に対する NTE-122 の作用を検討した。コレステロール生合成系の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素 (HepG2 細胞可溶化液), 脂肪酸と coenzyme A からアシル CoA を形成するアシル CoA 合成酵素 (ウサギ肝臓ミクロソーム), 細胞内に取り込んだコレステロールエステルをリソソーム中で加水分解する aCEase (PMA 処理 THP-1 細胞可溶化液) および細胞内で ACAT の逆反応を行う nCEase (PMA 処理 THP-1 細胞可溶化液) の各活性に対して NTE-122 は 10⁻⁵ M までほとんど阻害作用を示さなかった。また, NTE-122 は HDL が末梢組織から引き抜いたコレステロールをエステル化し, 肝臓への逆転送に関与している LCAT (ウサギ血漿), TG 生合成に関与している AGAT (ラット肝臓ミクロソーム) ならびにコレステロールから胆汁酸を生合成する過程の律速酵素であるコレステロール 7 α -水酸化酵素 (ラット肝臓ミクロソーム) の各活性に対しても 10⁻⁵ M までほとんど影響を与えなかった。従って, いずれの酵素活性に対しても IC₅₀ 値は 10⁻⁵ M 以上であった (Table 7)。さらに, NTE-122 の HepG2 細胞におけるコレステロール生合成に対しても 10⁻⁵ M まで有意な阻害作用を示さなかった (Table 8)。

Table 7 Effect of NTE-122 on the activity of various lipid metabolic enzymes

Enzymes	Origin	IC ₅₀ (M)
HMG-CoA reductase	HepG2	> 10 ⁻⁵
Acyl-CoA synthetase	Rabbit liver	> 10 ⁻⁵
Acid cholesterol esterase	PMA-treated THP-1	> 10 ⁻⁵
Neutral cholesterol esterase	PMA-treated THP-1	> 10 ⁻⁵
LCAT	Rabbit plasma	> 10 ⁻⁵
AGAT	Rat liver	> 10 ⁻⁵
Cholesterol 7 α -hydroxylase	Rat liver	> 10 ⁻⁵

Table 8 Effect of NTE-122 on incorporation of [¹⁴C]acetate into cellular cholesterol in HepG2 cells

Drug	Concentration (M)	[¹⁴ C]Cholesterol synthesis (nmol incorporation/mg cell protein)
None		5.99 \pm 0.00
NTE-122	10 ⁻⁸	6.29 \pm 0.19
	10 ⁻⁷	6.09 \pm 0.05
	10 ⁻⁶	5.53 \pm 0.58
	10 ⁻⁵	5.84 \pm 0.04

Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate assays.

4. 考察

マウスの肝臓および小腸の ACAT 活性は ACAT-1 遺伝子をノックアウトしても減少しなかったこと(9), これらの組織における ACAT-1 の発現が副腎等の他の組織に比べ非常に低いこと(13)から, マウスの肝臓および小腸の ACAT 活性の主体は ACAT-2 であると考えられている(12). 一方, ACAT-1 ノックアウトマウスではマクロファージの細胞コレステロールエステル化活性がみられなくなることから, マウスマクロファージにおける ACAT 活性は ACAT-1 によると考えられている(9). また, Kinnunen らは化学修飾薬 diethyl pyrocarbonate に対するウサギ各組織の ACAT 活性の感受性の違いから, 肝臓ならびに小腸の ACAT 活性は副腎等の ACAT 活性と異なる, すなわち異なるアイソザイムである可能性を示している(39). Kawasaki らはラットの副腎 ACAT は 4 量体であるのに対し, 肝臓 ACAT は単量体であることを示した(40). さらに, ACAT 阻害薬 NTE-122, E5324 および CI-976 が肝臓 ACAT 活性を強く阻害したのに対し, 別の ACAT 阻害薬 58-035 は副腎 ACAT 活性を強く阻害した (40). 従って, ラットでもマウスやウサギの場合と同様, 副腎と肝臓の ACAT は異なり(40), ラットにおいても肝臓 ACAT 活性は ACAT-2 による可能性が考えられる. ヒトについては, Lee らが肝臓の ACAT 活性は ACAT-1 が担っていると報告している(14). しかし, ヒトの小腸ならびに肝臓でも ACAT-2 の mRNA の発現が認められ, HepG2 ならびに CaCo-2 細胞でも ACAT-2 の発現が確認されているが, PMA 処理 THP-1 細胞では ACAT-2 の発現は認められていない(10). さらに, 霊長類のアフリカミドリザルでも, 他の組織と異なり肝臓および小腸においてのみ ACAT-2 の mRNA が ACAT-1 の mRNA に比べ非常に強く発現している(11). 従って, 副腎, マクロファージ等の組織における ACAT 活性は ACAT-1 により, 小腸では ACAT-2 が活性の主体であることが種を問わず共通である可能性が強い. また, 肝臓についても ACAT-2 がコレステロールエステル形成に関与していることが推察される.

本実験結果において, ACAT-2 が発現・機能していると考えられる肝臓および小腸

のミクロソーム ACAT 活性に対する NTE-122 の阻害作用はヒト培養細胞と他の実験動物の間であまり大きな差異がみられなかった。これに対し、ACAT-1 のみを発現していると考えられるマクロファージの ACAT 活性については、NTE-122 は他の実験動物に比べヒト培養細胞に対して強い阻害作用を示した。一方、対照薬として用いた E5324 および CI-976 では、組織ならびに種の違いによる ACAT 阻害作用の差異が NTE-122 に比べ小さかった。この傾向は細胞レベルでのコレステロールエステル化活性（細胞 ACAT 活性）に対する作用でも同様であった。これらの成績は使用した標本の違いによる可能性も考えられるが、NTE-122 による ACAT 活性阻害作用が他の ACAT 阻害薬と異なり、ACAT-2 については種差は比較的小さいのに対し、ACAT-1 については種差が大きく、ヒトに対してより強力な作用を有していることが推察される。ヒト ACAT-1 の推定アミノ酸配列はマウスおよびラットの ACAT-1 と各々 87%、83% の高い相同性を示しているが、その違いの多くはアミノ末端側に局在している(5, 7)。従って、NTE-122 の ACAT 阻害作用の違いは ACAT-1 タンパク質のアミノ末端側の構造に依存していることが強く示唆された。さらに、この理由から NTE-122 の ACAT-1 タンパク質との結合部位または NTE-122 と ACAT-1 タンパク質との会合に影響を与える部分がアミノ末端部位に存在すると予想された。

一方、NTE-122 は 10^{-7} M で HepG2 細胞の細胞コレステロールエステル化活性を 98.7% 阻害したが、同じ濃度で細胞 TG ならびに細胞 PL の合成には有意な阻害作用を示さなかった。この結果は、コレステロールエステル合成と同様にアシル CoA を基質とする TG および PL の生合成系に対し、NTE-122 が影響しないことを示している。また、HMG-CoA 還元酵素等の ACAT 以外の脂質代謝酵素および HepG2 細胞におけるコレステロール生合成に対し、NTE-122 は 10^{-5} M まで阻害作用を示さなかった。これらの結果より、NTE-122 は ACAT 活性のみを強く阻害し、他の脂質代謝に対して阻害作用を示さないと結論された。

5. 小括

新規 ACAT 阻害薬、NTE-122 の ACAT 阻害作用の強度、阻害様式ならびに酵素阻害特異性を検討した。NTE-122 は酵素レベルおよび細胞レベルの両方において、ヒト培養細胞（HepG2 細胞、CaCo-2 細胞、PMA 処理 THP-1 細胞）の各 ACAT 活性を他の ACAT 阻害薬よりも強力に阻害した。肝臓および小腸においてはヒトの培養細胞と他の実験動物（ウサギ、ラット、マウス）との間で NTE-122 の阻害作用はほぼ同程度であったが、ACAT-1 のみが発現していると考えられるマクロファージにおいては NTE-122 は実験動物に比べヒトの培養細胞の ACAT 活性を強力に阻害した。また、NTE-122 は PMA 処理 THP-1 細胞ならびに HepG2 細胞の両者において拮抗阻害を示した。さらに、NTE-122 は ACAT 以外の脂質代謝酵素である HMG-CoA 還元酵素、アシル CoA 合成酵素、aCEase, nCEase, LCAT, AGAT ならびにコレステロール 7α -水酸化酵素の各活性に対し阻害作用をほとんど示さなかった。また、細胞レベルでのコレステロール、TG および PL の生合成に対しても阻害作用を示さなかった。これらの結果から、NTE-122 は ACAT 活性を強力に拮抗的かつ選択的に阻害することが確認された。

第2章 培養肝細胞のアポリポタンパク B 含有リポタンパク質分泌および胆汁酸分泌に対する作用

1. 緒言

肝臓はコレステロール代謝における主要臓器である。肝臓において生合成または受容体を介して取り込まれたりポタンパク質（カイロミクロン，LDL 等）由来のコレステロールは ACAT によりエステル化される。エステル化されたコレステロールが VLDL 粒子に脂質核として取り込まれた後，VLDL は血中へ放出され，末梢組織にコレステロールを供給する(41, 42)。肝臓からの VLDL 分泌は虚血性冠動脈疾患の発症と相関している血漿 LDL 値に直接的に影響している(43)。VLDL は構成脂質として TG，コレステロール，コレステロールエステルおよび PL を，主要構成タンパク質としてアポリポタンパク B100（アポ B）を含んでいる(2, 44)。これらの中で，TG は肝細胞における VLDL の形成・分泌の強力な調節因子であることが知られている (2, 45, 46)。一方，肝細胞のコレステロールエステル産生がアポ B 分泌を増加させたり(47, 48)，分泌されるリポタンパク質のコレステロールエステル含量を増加させる(49, 50)ことも報告されている。また，ACAT 活性の阻害により肝臓コレステロールエステルが減少し，また VLDL 分泌も阻害されることを示唆する知見もある(51, 52)。25-ヒドロキシコレステロールは ACAT 活性を刺激し(2)，HepG2 細胞からのアポ B 含有リポタンパク質（VLDL に相当）の分泌を増大させる(48)。これに対し，ACAT 阻害薬 FCE27677 は，25-ヒドロキシコレステロールで処理した HepG2 細胞のアポ B 含有リポタンパク質の分泌を抑制することが報告されている(52)。しかし，HepG2 細胞によるアポ B 分泌は ACAT 阻害薬 CL 277,082 では抑制されるが，別の ACAT 阻害薬である 447C88 では抑制されないという報告(53)もあり，ACAT 阻害と VLDL 分泌との関係には不明な点が残る。本章では NTE-122 の肝細胞の VLDL 分泌に対する作用を検討する目的で，HepG2 細胞を用いてアポ B 含有リポタンパク質の構成成分，コレ

ステロールエステル，TG ならびにアポ B の分泌量を定量し，E5324 ならびに CI-976 と比較した。

一方，コレステロールは肝臓において胆汁酸に転換されると同時に胆汁酸とともに胆汁として体外に排泄される(54)。胆汁はコレステロールの唯一の体外排泄経路であることから，胆汁酸合成の促進は血中コレステロール値を低下させると考えられる。実際，臨床で使用されている高脂血症治療薬であるプロブコールが胆汁酸合成を促進するという報告がある(55)。肝臓の遊離コレステロール含量の増加により胆汁酸合成が刺激されることから，ACAT 阻害薬もまた肝臓における胆汁酸合成を促進し，胆汁を介してのコレステロール分泌を亢進することが実証された(21, 56, 57)。これらの理由から，NTE-122 の HepG2 細胞における胆汁酸分泌に対する作用をプロブコールと比較検討した。

2. 実験材料ならびに実験方法

2. 1. 使用薬物

NTE-122，E5324 および CI-976 は日清食品（株）中央研究所において合成されたものを，プロブコールは Sigma 社製のものを使用した。[9,10(n)-³H]オレイン酸（370 GBq/mmol）は Amersham 社製のものを，[4-¹⁴C]コレステロール（1.9 GBq/mmol）は New England Nuclear 社製のものを，アクアゾル 2 は Packard 社製のものを，FBS は Filtron 社製または PAA Laboratories 社製のものを，MEM 培地，PBS(-)，ペニシリン，ストレプトマイシン，NEAA および Pyr は Gibco BRL 社製のものを使用した。Monoclonal anti-human apolipoprotein B は Medix Biotec 社製のものを，sheep anti-human apolipoprotein B peroxidase は The Binding Site Limited 社製のものを，ABTS 溶液は Boehringer Mannheim Biochemica 社製のものを，Apo B, lipoprotein low density は O.E.M. Concept 社製のものを使用した。他の試薬は全て市販の特級試薬を使用した。

2. 2. 使用細胞株および培養条件

ヒト肝細胞癌株 HepG2 は大日本製薬より購入し、10% FBS 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地中で、37℃、飽和湿度および 5% CO₂ の条件下で継代培養した。

2. 3. HepG2 細胞におけるコレステロールエステルおよび TG 分泌量の測定

Salisbury ら(30), Musanti ら(52)および Yanagita ら(58)の方法に準じ、細胞の[³H]コレステロールエステル, [³H]TG 含量をコレステロールエステル, TG 合成量ならびに培養上清の[³H]コレステロールエステル, [³H]TG 含量をコレステロールエステル, TG 分泌量として評価した。HepG2 細胞を培養用 12 well plate に 1×10⁶ 個/well 播種し、10% FBS 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地 1 ml 中で 3 日間培養した後、新鮮培地に交換し、さらに 18 時間培養した。細胞を PBS(-)で洗浄した後、25-ヒドロキシコレステロール 5 μg/ml を含む 1.5% BSA 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地 0.9 ml を well に加え 2.5 時間培養した。次に、1% DMSO 含有培地に溶解した被験物質溶液 0.1 ml を well に加え、30 分間培養した。培養後、5 mM [³H]オレイン酸-12% BSA (29.6 or 296 MBq/mmol of oleate) 20 μl を well に加え、さらに 18 時間培養した。

培養上清中の脂質は、培地を 2,200×g、4℃で 10 分間遠心分離し、浮遊している細胞等を取り除いた後、Bligh-Dyer 法(59)で抽出した。培養上清 0.95 ml にクロロホルム：メタノール混液 (1:2, v/v) 3 ml, クロロホルム 1 ml, 超純水 1 ml を順次攪拌しながら添加し、得られたクロロホルム層を脂質測定用試料とした。細胞脂質は、n-ヘキサン：イソプロピルアルコール混液 (3:2, v/v) を用いて細胞コレステロールエステル化活性測定 (第 1 章) の場合と同様の方法で抽出した。得られた細胞ならびに培地の脂質試料にトリオレイン, オレイン酸, コレステリルオレイン酸および L-α-フォスファチジルコリンを各々 50 μg 加えた。これらを細胞コレステロールエステル化活性測定 (第 1 章) の場合と同様の方法でコレステロールエステルならびに TG を分離し、放射活性を測定した。[³H]オレイン酸の比活性よりコレステロールエステ

ルおよび TG の[³H]オレイン酸取り込み量を求め、コレステロールエステルおよび TG の合成ならびに分泌量とし、細胞タンパク質量で補正した。

2. 4. HepG2 細胞におけるアポ B 分泌量の測定

5 mM [³H]オレイン酸-12% BSA を 5 mM オレイン酸-12% BSA に変更した以外は HepG2 細胞におけるコレステロールエステルおよび TG 分泌量の測定の場合と同様の方法で培養を行い、その培養上清を測定試料とした。

アポ B の定量は Forte らの方法(60)に準じてサンドウィッチ ELISA 法で実施した。一次抗体 (monoclonal anti-human apolipoprotein B) 0.86~1.75 mg/ml を 96 well ELISA plate の well に 0.1 ml 加え、4℃で 18 時間インキュベートした。洗浄用緩衝液 (0.05% Tween 20 添加 PBS(-)) で well を 6 回洗浄した後、ブロッキング緩衝液 (1% BSA 添加洗浄用緩衝液) 0.2 ml を加え、37℃で 2 時間インキュベートした。洗浄用緩衝液で well を 6 回洗浄した後、試料液 0.1 ml を加え、37℃で 1 時間インキュベートした。同様の方法で洗浄した後、ブロッキング緩衝液で 2,000 倍に希釈した二次抗体 (sheep anti-human apolipoprotein B peroxidase) 0.1 ml を well に加え、37℃で 1 時間インキュベートした。同様の方法で洗浄した後、ABTS 溶液 0.1 ml を well に加え、37℃で 5~30 分間インキュベートして発色させた後、450 nm の吸光度を測定した。標準物質として Apo B, lipoprotein low density を用いた。

2. 5. HepG2 細胞における胆汁酸分泌量の測定

Murakami らの方法(57)に準じて行った。HepG2 細胞を培養用 24 well plate に 2×10⁵ 個/well 播種し、10% FBS 添加 MEM/NEAA/Pyr 培地 0.5 ml 中で 2 日間培養した。細胞を PBS(-)で洗浄した後、19.5 μM [4-¹⁴C]コレステロール (18.5 kBq/well) を含む培地に交換し、さらに 24 時間培養した。細胞を PBS(-)で 3 回洗浄した後、被験物質の DMSO 溶液を含む培地 1 ml (最終 DMSO 濃度 0.1%) を加え、48 時間培養した。培

養上清を $2,200 \times g$ で 5 分間遠心分離し、胆汁酸測定用試料とした。細胞タンパク質の定量は細胞コレステロールエステル化活性測定（第 1 章）の場合と同様の方法で行った。培養上清 0.45 ml をメタノール 2 ml, 次いで超純水 2 ml で洗浄した Amplep C18 カラム（Amersham 社製）に乗せ、超純水 2 ml で洗浄した後、50% エタノール 2 ml で胆汁酸を溶出させた。得られた胆汁酸画分をアクアゾル 2 と混合し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。 $[4-^{14}\text{C}]$ コレステロールの比活性より $[^{14}\text{C}]$ 胆汁酸量を求め、細胞タンパク質量で補正した。

2. 6. 統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で表示した。有意差検定は 2 群間の場合はまず F 検定を行い、正規分布である場合は Student's *t*-検定で実施し、正規分布でない場合は Aspin-Welch 法で実施した。多群間の場合は Dunnett 法により実施した。 $P < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

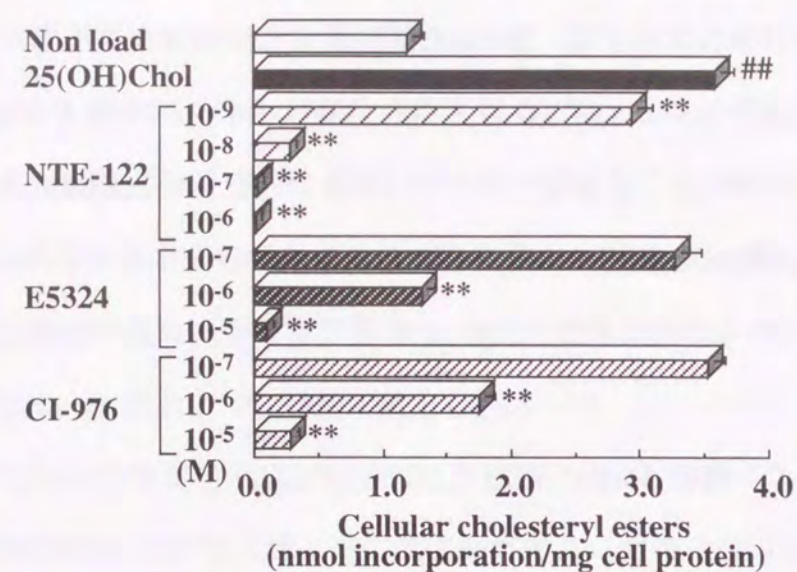
3. 実験結果

3. 1. コレステロールエステル, TG およびアポ B 分泌に対する作用

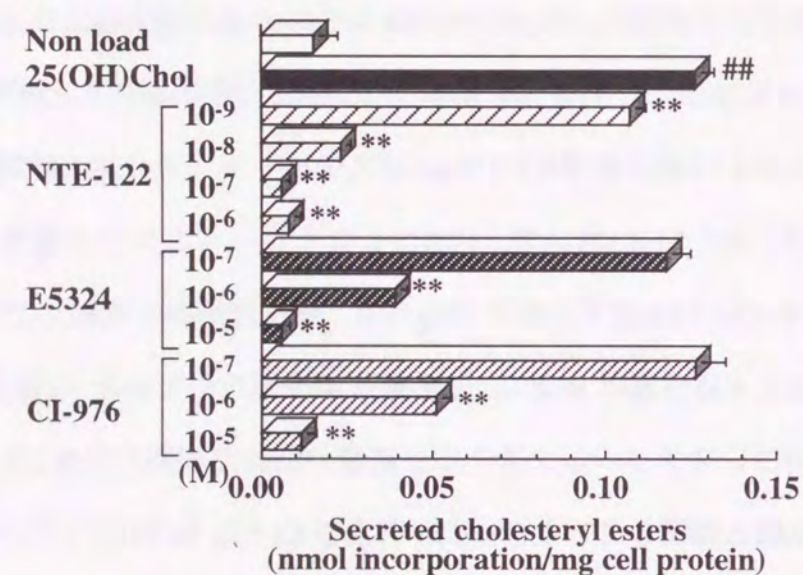
コレステロールエステルおよび TG はアポ B 含有リポタンパク質 (VLDL, LDL 等) の核脂質であり(44, 45), アポ B はこれらのリポタンパク質の主要構成タンパク質である(44)。従って, HepG2 細胞から分泌されるコレステロールエステル, TG ならびにアポ B の量を求めることにより, アポ B 含有リポタンパク質の分泌を知ることが出来る。

まず, $[^3\text{H}]$ オレイン酸の HepG2 細胞における合成ならびに分泌された脂質への取り込みにより, NTE-122 のコレステロールエステルおよび TG 分泌に対する作用を E5324 ならびに CI-976 と比較検討した。25-ヒドロキシコレステロール ($5 \mu\text{g/ml}$) による ACAT の刺激により $[^3\text{H}]$ コレステロールエステルの細胞含量および分泌量は各々 3 倍, 8 倍に有意に増加し, $[^3\text{H}]$ TG の分泌量も 1.5 倍に有意に増加した (Fig. 12, 13)。これに対し, NTE-122 は濃度依存的に $[^3\text{H}]$ コレステロールエステルの細胞含量および分泌量を減少させ, 10^{-6} M において, $[^3\text{H}]$ コレステロールエステル量を細胞内では 99.5%, 培養上清中では 94%低下させた (Fig. 12)。無処理細胞と比較しても, 細胞 $[^3\text{H}]$ コレステロールエステル含量は 98.8%, 分泌量は 48%減少していた (Fig. 12)。また, HepG2 細胞の $[^3\text{H}]$ コレステロールエステル分泌量の動態は細胞内 $[^3\text{H}]$ コレステロールエステル含量の動態と相関していた。E5324 および CI-976 も $[^3\text{H}]$ コレステロールエステルの細胞内含量および分泌量を $10^{-6} \sim 10^{-7} \text{ M}$ において有意に減少させた (Fig. 12)。一方, NTE-122 は HepG2 細胞内 $[^3\text{H}]$ TG 含量に影響を与えずに $[^3\text{H}]$ TG 分泌量を有意に減少させ, 10^{-6} M において, 25-ヒドロキシコレステロール処理細胞に比べ $[^3\text{H}]$ TG 分泌量を 31%低下させた。しかし, その作用はコレステロールエステルの場合と比較して弱かった (Fig. 13)。E5324 も $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ M}$ において, $[^3\text{H}]$ TG 合成に影響を与えずに, $[^3\text{H}]$ TG 分泌をわずかではあるが有意に減少させた。CI-976 は $[^3\text{H}]$ TG 含量を若干増加させたが, 分泌量については減少傾向を示したのみであった (Fig. 13)。

(a) Cellular cholesteryl esters



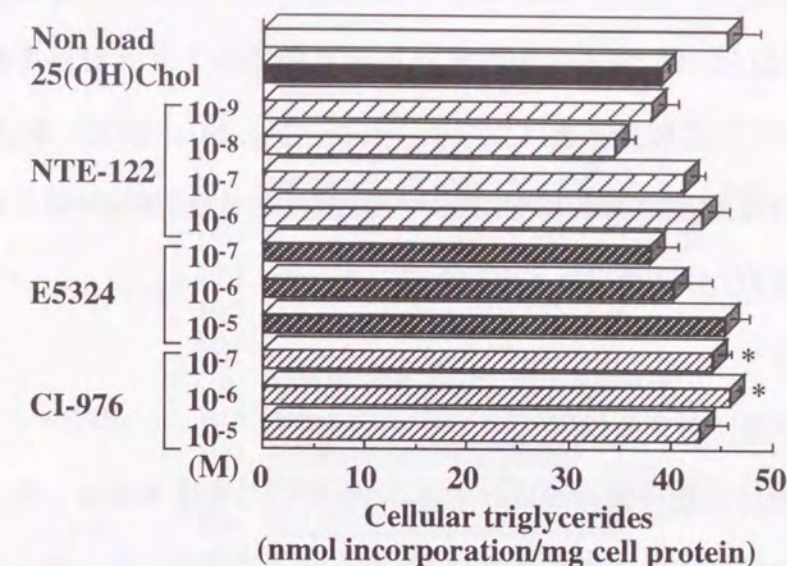
(b) Secreted cholesteryl esters



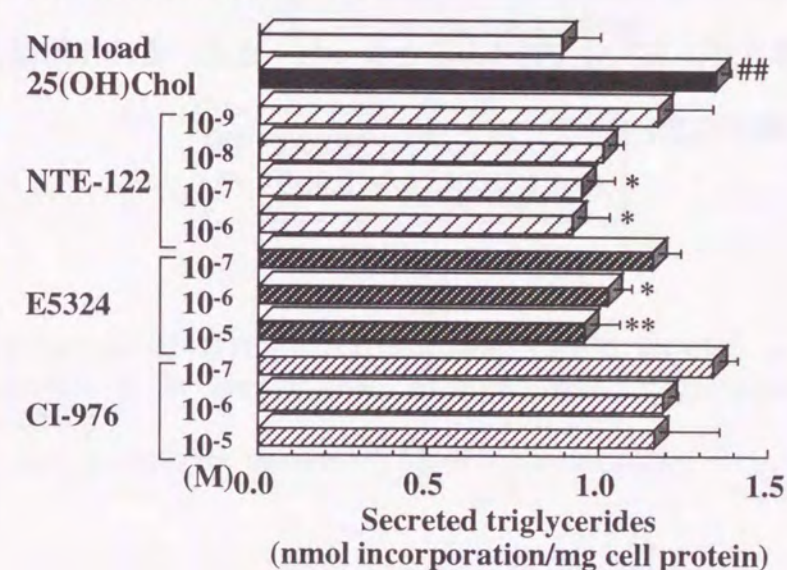
: P<0.01 (vs Non load)
** : P<0.01 (vs 25(OH)Chol)

Fig. 12 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on [³H]oleate incorporation into intracellular (a) and secreted (b) cholesteryl esters in HepG2 cells incubated with 25-hydroxycholesterol (25(OH)Chol). Each value represents the mean ± S.E.M. of triplicate assays.

(a) Cellular triglycerides



(b) Secreted triglycerides



: P<0.01 (vs Non load)
*, ** : P<0.05, 0.01 (vs 25(OH)Chol)

Fig. 13 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on [³H]oleate incorporation into intracellular (a) and secreted (b) triglycerides in HepG2 cells incubated with 25-hydroxycholesterol (25(OH)Chol). Each value represents the mean ± S.E.M. of triplicate assays.

次に、ELISA 法で HepG2 細胞のアポ B 分泌量を定量した。25-ヒドロキシコレステロールの作用により、HepG2 細胞のアポ B 分泌量は 1.4 倍に有意に増加した。これに対し、NTE-122 は 10^{-8} M 以上の濃度で HepG2 細胞のアポ B 分泌を有意に減少させ、 10^{-6} M においてアポ B 分泌量は 26% 低下した (Fig. 14)。E5324 および CI-976 も 10^{-6} M 以上で HepG2 細胞のアポ B 分泌を有意に減少させた (Fig. 14)。また、アポ B 分泌量の低下率は TG 分泌量の低下率と近似していた。

3. 2. 胆汁酸分泌に対する作用

HepG2 細胞における胆汁酸合成に対する NTE-122 の作用を検討した。胆汁酸合成を刺激することが知られているプロブコール(56)は、 $[^{14}\text{C}]$ コレステロールからの胆汁酸の合成量を増大させた (Fig. 15)。NTE-122 も HepG2 細胞の胆汁酸合成を濃度依存的かつ有意に上昇させ、 10^{-6} M では 1.5 倍となった。また、その作用はプロブコールに比べ 10 倍以上強かった。

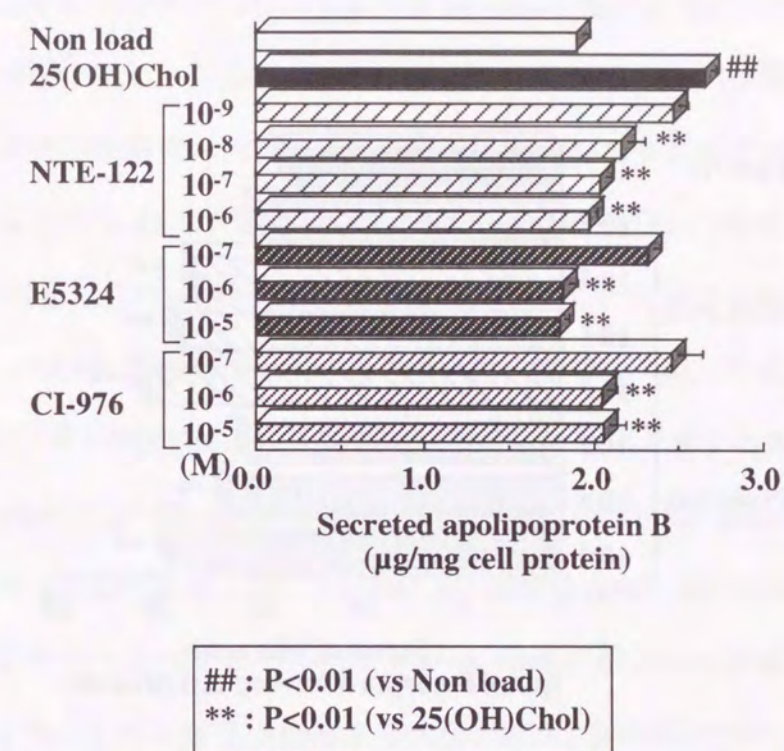


Fig. 14 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on the secretion of apolipoprotein B in HepG2 cells incubated with 25-hydroxycholesterol (25(OH)Chol). Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate assays.

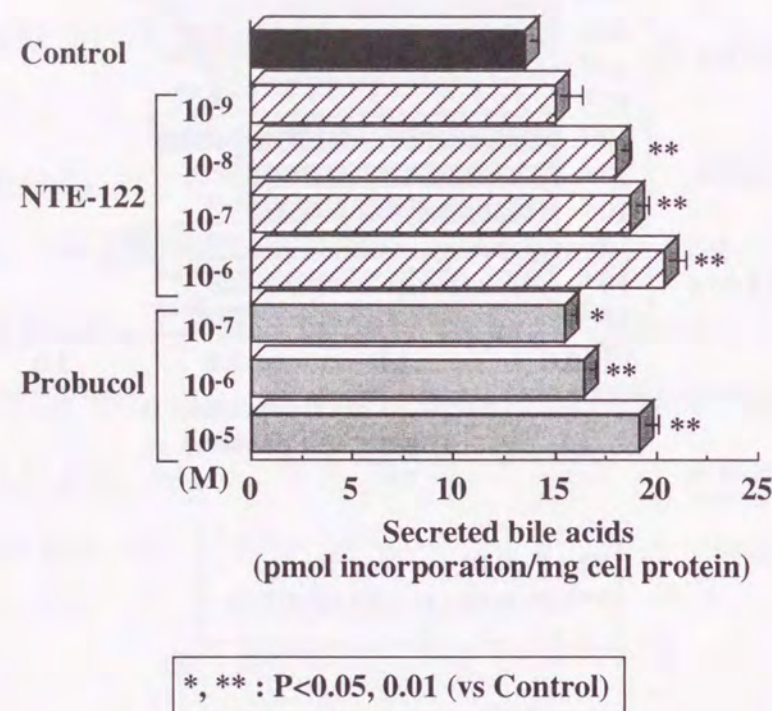


Fig. 15 Effects of NTE-122 and probucol on the secretion of [¹⁴C]bile acids in HepG2 cells.
Each value represents the mean ± S.E.M. of triplicate assays.

4. 考察

肝臓においてコレステロールは ACAT によりエステル化されて VLDL に取り込まれた後、血中に放出され、末梢組織に供給される(41, 42). NTE-122 は ACAT 活性化を目的として 25-ヒドロキシコレステロール処理した HepG2 細胞のアポ B 含有リポタンパク質の分泌に対し、低濃度 (10^{-8} M 以下) ではリポタンパク質のコレステロール含量を低下させ、高濃度 (10^{-7} M 以上) ではリポタンパク質分泌量自体を低下させた. この傾向は E5324 および CI-976 でも同様であった. HepG2 細胞の脂質およびアポ B 分泌における ACAT の役割については議論が多く、統一された結論は出されていない. 特に, ACAT 阻害薬 58-035(20)を用いた研究では, ACAT 阻害によりアポ B 分泌が減少(61), 増加傾向(62), 変化しない(46)といった, 矛盾する報告がなされている. 最近, Graham ら(53)は ACAT 阻害薬 CL 277,082 は HepG2 細胞のアポ B 含有リポタンパク質の分泌を抑制したが, 別の ACAT 阻害薬 C447C88 は抑制しなかったことから, コレステロールのエステル化はアポ B 含有リポタンパク質の分泌と関連性がないと結論した. その一方で, Musanti ら(52)は ACAT 阻害薬 FCE27677 が, 特に 25-ヒドロキシコレステロールの存在下における HepG2 細胞のアポ B 分泌を抑制することを示している. 本実験において, 25-ヒドロキシコレステロールは HepG2 細胞のコレステロールエステル, TG ならびにアポ B 分泌を増加させたが, NTE-122 はこの増加を阻止した. 25-ヒドロキシコレステロールによる ACAT 活性化は, ACAT 分子のコレステロール結合部位に酸化ステロールが結合することにより生ずるコレステロールによるアロステリック作用を増強するためと考えられている(2). しかし, 実際には 25-ヒドロキシコレステロールが直接的に ACAT の酵素活性を活性化するのか, または他の要因による二次的作用によるものかは不明である. 一方, 25-ヒドロキシコレステロールによる TG およびアポ B 分泌の増加はコレステロールエステル分泌の増加に比べ少なかった. また, NTE-122 はコレステロールエステルの分泌量を通常状態以下まで減少させたのに対し, TG およびアポ B については 25-ヒドロキシコレス

テロール刺激により増加した分を減少させたのみであった。これらの結果から、25-ヒドロキシコレステロールの作用によるアポ B 含有リポタンパク質分泌の増加は、ACAT 刺激によるコレステロールエステル合成の二次的作用であり、NTE-122 はこのコレステロールエステル合成を阻害することにより、25-ヒドロキシコレステロール刺激により増加したアポ B 含有リポタンパク質の分泌を抑制したと考えられる。

一方、肝臓はコレステロールエステルをリポタンパク質に組み込んで血中に放出する以外に遊離コレステロールを胆汁酸へ転換し、胆汁を介してコレステロールを腸管内に排泄する(54)。従って、プロブコールの様に(55)胆汁酸分泌を促進させる薬物はコレステロール低下作用に寄与することが知られている。肝臓で ACAT を阻害すると遊離コレステロール含量が増加することが予想される。従って、ACAT 阻害薬の臨床適用において、肝臓中の過剰な遊離コレステロールが胆汁酸に転換され、胆汁に排泄されるか否かを検討することは重要である。実際、ACAT 阻害薬 58-035(56)および HL-004(57)がラットおよび HepG2 細胞において、ACAT 阻害によって遊離コレステロールを増加させ、胆汁酸ならびに胆汁分泌を促進させることが報告されている。本実験において、NTE-122 も HepG2 細胞の胆汁酸合成・分泌を 10^{-8} M 以上で増加させた。この結果から、本化合物が ACAT 阻害により肝細胞中で増加した遊離コレステロールからの胆汁酸の合成を亢進し、胆汁を介したコレステロールの体外への排泄を促進することが示唆された。

以上の成績から、NTE-122 は肝臓 ACAT 阻害により、肝臓から分泌される VLDL 中のコレステロールエステル含量および VLDL 粒子数を減少させ、また、本化合物が二次的に胆汁分泌量を増加させることにより、コレステロール低下作用を示すことが示唆された。

5. 小括

NTE-122 の HepG2 細胞におけるアポ B 含有リポタンパク質および胆汁酸分泌に対する作用を検討した。ACAT 活性を刺激する 25-ヒドロキシコレステロール (5 μ g/ml) は HepG2 細胞の [3 H]オレイン酸由来のコレステロールエステルおよび TG の分泌を有意に増加させ、アポ B の分泌も増加させた。これに対し、NTE-122 は細胞内コレステロールエステル合成を強力に抑制し、同時に細胞外へのコレステロールエステル分泌も抑制した。また、NTE-122 は TG 合成を抑制せずに TG 分泌を抑制し、さらにアポ B 分泌も抑制した。これらの結果から、NTE-122 がアポ B 含有リポタンパク質のコレステロール含量を減少させ、さらにその分泌を抑制したことが示唆された。E5324 ならびに CI-976 も 25-ヒドロキシコレステロール存在下における HepG2 細胞のコレステロールエステル、TG およびアポ B の分泌を抑制、もしくは抑制する傾向を示したが、それらの作用は NTE-122 に比べ弱いものであった。さらに、NTE-122 は HepG2 細胞における [14 C]コレステロールからの胆汁酸合成を増加させた。以上の結果から、NTE-122 が ACAT 阻害薬の標的の一つである肝臓から分泌される VLDL 粒子中のコレステロール含量ならびに VLDL 粒子数を減少させ、また、胆汁酸形成を刺激することによりコレステロール低下作用を示すことが示唆された。

第3章 培養腸粘膜細胞の脂質分泌に対する作用

1. 緒言

食餌性コレステロールは遊離コレステロールとして小腸粘膜に取り込まれた後、ACAT の作用によりエステル化され、TG とともにカイロミクロンに取り込まれる。カイロミクロンはリンパ管に放出され、その結果、食餌性コレステロールは体内に取り込まれる (2)。カイロミクロンの構造は VLDL や LDL と同様で、中心は疎水性のコレステロールエステルおよび TG から形成された脂質核が存在する。その表層は脂質成分として両親媒性の PL、遊離コレステロール、タンパク質成分としてアポリポタンパク質 (AI, B48 等) により構成されている。従って、小腸粘膜から分泌される脂質のうち、コレステロールエステルおよび TG の分泌量を測定することにより、カイロミクロンの分泌量つまり小腸粘膜から体内への脂質吸収量を推定することができる。本章では NTE-122 のヒトにおける小腸粘膜の脂質吸収に対する作用を予想することを目的として、メンブレンフィルター上に培養した CaCo-2 細胞を用いて、NTE-122 のコレステロールエステルおよび TG 分泌に対する作用を E5324 ならびに CI-976 と比較検討した。

2. 実験材料ならびに実験方法

2. 1. 使用薬物

NTE-122, E5324 および CI-976 は日清食品 (株) 中央研究所において合成されたものを使用した。[9,10(n)-³H]オレイン酸 (370 GBq/mmol) は Amersham 社製のものを用いた。FBS は PAA Laboratories 社製のものを、DMEM 培地、199 培地、PBS(-)、ペニシリン、ストレプトマイシンならびに NEAA は Gibco BRL 社製のものを使用した。他の試薬は全て市販の特級試薬を使用した。

2. 2. 使用細胞株および培養条件

ヒト結腸癌株 CaCo-2 は大日本製薬より購入し、10% FBS 添加 DMEM/NEAA 培地中で、37℃、飽和湿度および 5% CO₂ の条件下で継代培養した。

2. 3. CaCo-2 の細胞コレステロールエステルおよび TG 分泌量測定

Field らの方法(31, 64)に準じて行った (Fig. 16)。CaCo-2 細胞をトランズウェル・クリアー 12 well plate (インサートメンブレン孔サイズ 0.4 μm : Corning Corstar 社製) のインサートメンブレン上に 2×10⁵ 個播種し、10% FBS 添加 DMEM/NEAA 培地 0.5 ml をトランズウェルインサート内 (メンブレン上 : 細胞粘膜側) に、1.5 ml をトランズウェルインサート外 (メンブレン下 : 漿膜側) に加え、3 日毎に新鮮培地と交換して、15 日間培養した。細胞を PBS(-) で洗浄した後、0.2 mM コレステロール、5 mM タウロコール酸ナトリウム、0.05 mM L-α-フォスファチジルコリンを含む 1.5% BSA および 1 mM HEPES 添加 199 培地 (以下、1.5% BSA 添加 199/HEPES 培地と記す) 0.45 ml をトランズウェルインサート内に、1.5% BSA 添加 199/HEPES 培地 1.5 ml をトランズウェルインサート外に加えて 2.5 時間培養した。次に、1% DMSO 含有培地に溶解した被験物質溶液 50 μl をトランズウェルインサート内に加えて、30 分間培養した。5 mM [³H]オレイン酸-12% BSA (296 MBq/mmol of oleate) 20 μl をトランズウェルインサート内に加えて、さらに 18 時間培養した後、HepG2 細胞におけるコレステロールエステルおよび TG 分泌量測定 (第2章) の場合と同様の方法で細胞の [³H]コレステロールエステル、[³H]TG 含量をコレステロールエステル、TG 合成量ならびにトランズウェルインサート外の培養上清の [³H]コレステロールエステル、[³H]TG 含量をコレステロールエステル、TG 分泌量として定量した。各々の値は細胞タンパク質量で補正した。

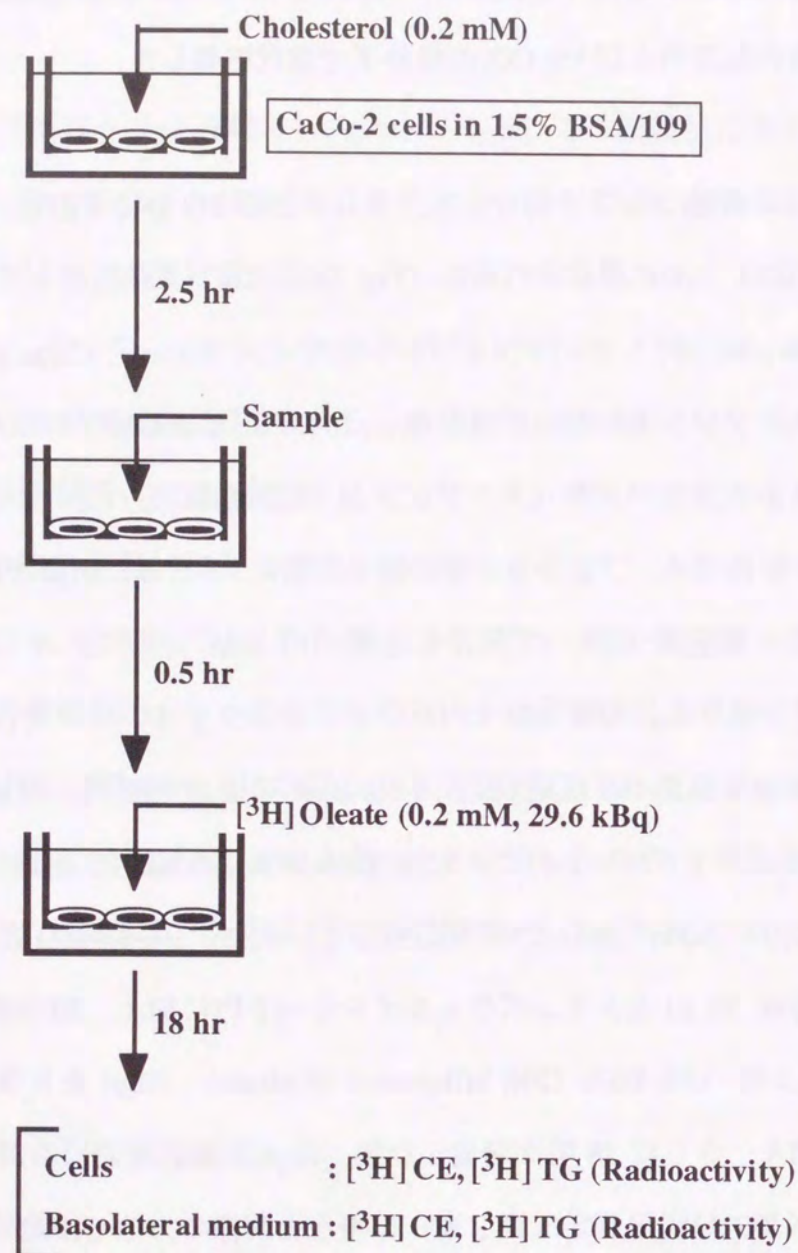


Fig. 16 Assay method of $[^3\text{H}]$ oleate incorporation into cellular and secreted cholesteryl esters (CE) and triglycerides (TG) in CaCo-2 cells cultured on membrane filter.

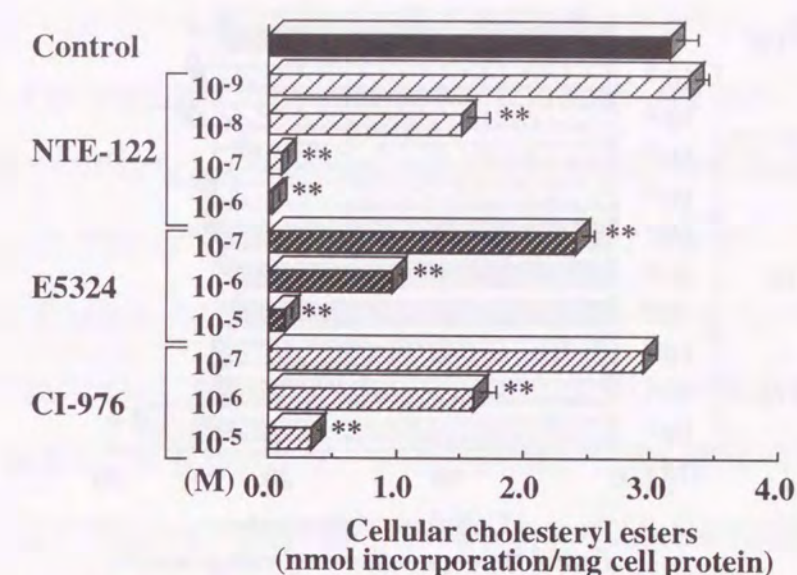
2. 4. 統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で表示した。有意差検定は 2 群間の場合はまず F 検定を行い、正規分布である場合は Student's t -検定で実施し、正規分布でない場合は Aspin-Welch 法で実施した。多群間の場合は Dunnett 法により実施した。P<0.05 の場合を有意差有りと判定した。

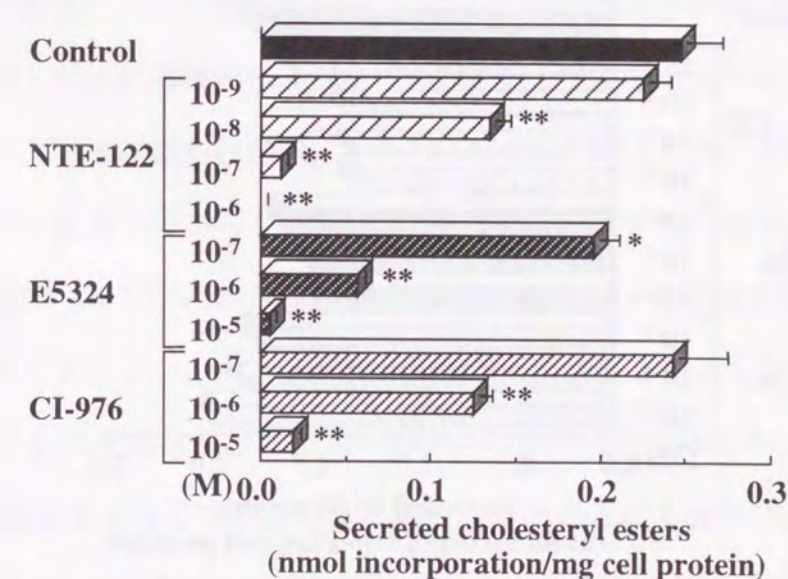
3. 実験結果

NTE-122 は 10^{-8} M 以上において CaCo-2 細胞の ^3H コレステロールエステル合成量および漿膜側への分泌量を濃度依存的かつ有意に減少させ、 10^{-6} M において ^3H コレステロールエステル量を細胞内では 99.1%, 漿膜側培養上清中で 99.9%低下させた. 一方, E5324 ならびに CI-976 も CaCo-2 細胞の ^3H コレステロールエステル合成量および漿膜側への分泌量を濃度依存的に減少させたが, それらの作用は NTE-122 に比べ 10~100 倍弱かった (Fig. 17). NTE-122 は CaCo-2 細胞の ^3H TG 合成量に対し有意な作用を示さなかったが, 漿膜側への ^3H TG 分泌量を用量依存的かつ 10^{-8} M 以上において有意に減少させた. しかし, その作用は ^3H コレステロールエステル分泌の場合と比べ弱かった (10^{-6} M : 26.7%低下). また, E5324 も NTE-122 と同様, CaCo-2 細胞の ^3H TG 合成を抑制せずに漿膜側への ^3H TG 分泌量を用量依存的に減少させたが, 有意な作用ではなかった. CI-976 は逆に用量依存的にコレステロール添加 CaCo-2 細胞の ^3H TG 合成量を増加させ, 漿膜側への ^3H TG 分泌量を濃度依存的に増加させる傾向を示した (Fig. 18).

(a) Cellular cholesteryl esters



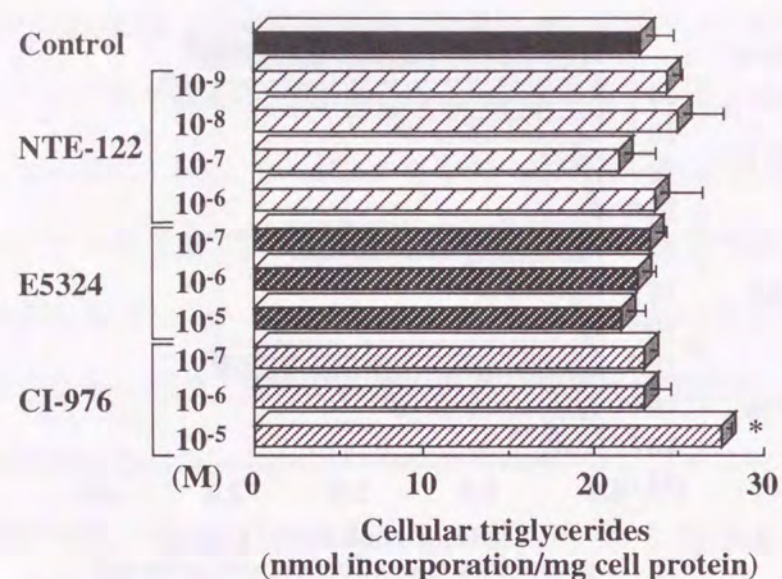
(b) Secreted cholesteryl esters



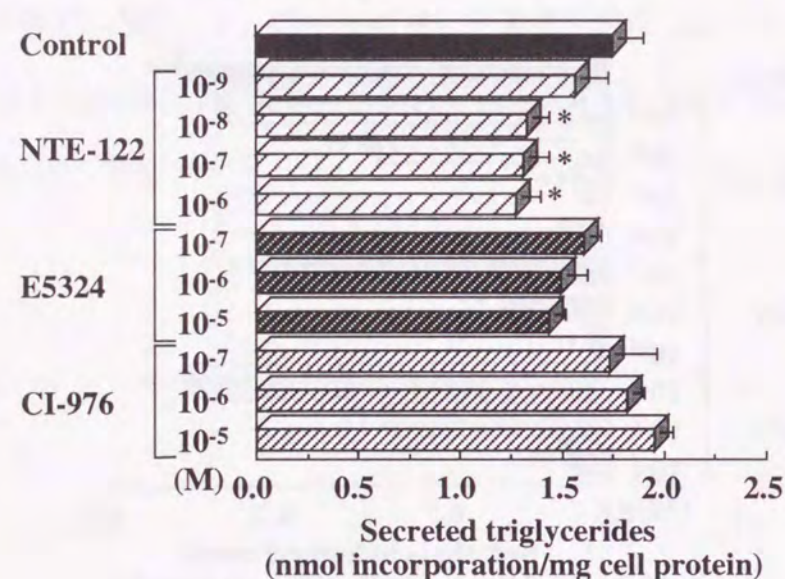
*, ** : $P < 0.05, 0.01$ (vs Control)

Fig. 17 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on ^3H oleate incorporation into intracellular (a) and secreted (b) cholesteryl esters in CaCo-2 cells. Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate assays.

(a) Cellular triglycerides



(b) Secreted triglycerides



* : P<0.05 (vs Control)

Fig. 18 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on [³H]oleate incorporation into intracellular (a) and secreted (b) triglycerides in CaCo-2 cells. Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate assays.

4. 考察

NTE-122 がメンブレンフィルター上に培養した CaCo-2 細胞から漿膜側へ分泌されるコレステロールエステルおよび TG の量を減少させたことから、本化合物が CaCo-2 細胞の ACAT 活性を阻害することでカイロミクロン分泌を抑制したことが示唆される。また、その作用は E5324 ならびに CI-976 に比べ 10 倍～100 倍強く、HepG2 細胞におけるアポ B 含有リポタンパク質分泌抑制作用（第 2 章参照）と同様、ACAT 阻害作用の強さ（Table 3）に比例していた。しかし、NTE-122 の TG 分泌抑制作用は相対的にコレステロールエステル合成および分泌抑制作用に比べ弱いものであった。これも HepG2 細胞のアポ B 含有リポタンパク質分泌における場合と同様であった。また、対照薬として用いた CI-976 はコレステロールエステル分泌は抑制したが、TG 分泌を抑制しなかった。この結果は Field らが報告した結果(64)に近似していた。これらの成績は肝細胞における場合と同様、コレステロールエステルが小腸粘膜のリポタンパク質形成・分泌に直接的に関与していないことを示唆している。小腸粘膜によるカイロミクロン分泌調節も肝細胞による VLDL 分泌調節と同様、TG によるアポ B 分解抑制に大きく依存していると考えられている(65)。従って、HepG2 細胞における結果と同様、NTE-122 が小腸粘膜のコレステロールエステル合成を阻害することにより、まずカイロミクロンのコレステロールエステル含量を減少させ、さらに二次的にカイロミクロンの形成ならびに分泌が抑制されたことが示唆される。換言すれば、NTE-122 は主としてカイロミクロンの質的な変化を通じて血中コレステロール低下作用に寄与していると考えられる。以上のことより、NTE-122 は CaCo-2 細胞のコレステロールエステル分泌を強力に抑制すると同時に TG 分泌も抑制し、これが NTE-122 の血中コレステロール低下作用に寄与する可能性が高いと判断される。

5. 小括

NTE-122 のヒト小腸粘膜の脂質吸収（体内への分泌）に対する作用を予測する目的で、メンブレンフィルター上に培養した CaCo-2 細胞を用いて、コレステロールエステルおよび TG 分泌に対する作用を E5324 ならびに CI-976 と比較検討した。その結果、NTE-122 は CaCo-2 細胞のコレステロールエステル合成および分泌を濃度依存的、かつ 10^{-8} M 以上において有意に抑制した。また、その作用は E5324 に比べ 10 倍以上、CI-976 に比べ 100 倍以上強力であった。さらに、NTE-122 は CaCo-2 細胞の TG 合成を抑制せずに、TG 分泌を濃度依存的、かつ 10^{-8} M 以上において有意に抑制した。一方、E5324 は TG 分泌を抑制する傾向を示したのみであり、CI-976 は TG 分泌抑制作用を全く示さなかった。しかし、NTE-122 において認められた TG 分泌抑制作用は、コレステロールエステル分泌抑制作用に比べ弱いものであった。以上のことから、NTE-122 は小腸粘膜から分泌されるカイロミクロンのコレステロール含量を低下させ、さらにはカイロミクロンの分泌量も減少させることが示唆された。

第4章 培養マクロファージ細胞の泡沫化抑制および脱泡沫化促進作用

1. 緒言

動脈硬化の発症過程において、細胞内に大量のコレステロールエステルを蓄積した泡沫細胞が粥状動脈硬化の初期病変を形成することが知られている (66~68)。血管壁内に侵入した血中単球由来マクロファージはスカベンジャー受容体を介して Ox-LDL 等の化学修飾 LDL を取り込み、細胞内にコレステロールエステルを蓄積し、泡沫細胞となる (2, 69)。細胞内に取り込まれた化学修飾 LDL はリソソームに運ばれ、コレステロールエステルは aCEase によって遊離コレステロールに水解される。生成した遊離コレステロールは ACAT により再エステル化され、脂肪滴として細胞質に蓄積する。泡沫細胞内の脂肪滴は nCEase による脱エステル化と、ACAT による再エステル化が拮抗しているコレステロールエステルサイクルと呼ばれる動的平衡にあることが知られている (Fig. 19) (70, 71)。

LDL とは逆に、組織に蓄積した余剰のコレステロールを引き抜き肝臓へ逆転送し、抗動脈硬化作用を示すのが HDL である (72, 73)。HDL の作用としては大きく 2 つに分けられている。一つは、化学修飾 LDL によって十分に泡沫化したマクロファージ泡沫細胞からコレステロールを引き抜く作用（脱泡沫化作用）(70, 74)であり、もう一つは、化学修飾 LDL と同時に存在した時にみられるマクロファージの泡沫化の抑制作用 (72, 73)である。泡沫化抑制作用は動脈硬化症進展の抑制に対応し、脱泡沫化作用は動脈硬化症退縮に対応する。Hakamata らは HDL によるコレステロールの引き抜きには「nCEase 依存性経路」と「nCEase 非依存性経路」の 2 種類のコレステロール移行経路が存在することを報告している (71)。脱泡沫化の場合は蓄積されたコレステロールエステルが nCEase の作用により水解され、遊離コレステロールが HDL により引き抜かれる nCEase 依存性経路のみに依存している。一方、泡沫化抑制では

nCEase 依存性経路とリソソーム由来の遊離コレステロールの一部が ACAT による再エステル化を受けずに直接 HDL により引き抜かれる nCEase 非依存性経路の両方の経路に依存している。また、泡沫化抑制の方が HDL によるコレステロール引き抜きが効果的であることも報告されている(71)。

ACAT 阻害薬は遊離コレステロールのエステル化を阻害することにより、細胞内の遊離コレステロールを増加させ、その結果、HDL によるコレステロールの引き抜きを促進することが知られている。しかし、ACAT 阻害薬 58-035(20)はマウスの腹腔マクロファージ泡沫細胞の HDL による脱泡沫化作用を促進した(70, 74)が、ラット腹腔マクロファージ泡沫細胞ではその様な作用を示さなかった(71, 74)。この様な HDL による脱泡沫化作用の種差は、nCEase の反応速度の違い（高等ほ乳動物ほど遅い）によることが示唆されている(74)。一方、58-035 はラット腹腔マクロファージにおける nCEase 非依存性経路を含む HDL の泡沫化抑制作用に対し強い促進効果を示している(71)。これらの結果は、HDL 単独のコレステロール引き抜きと同様、ACAT 阻害薬は動脈硬化進行の抑制には非常に効果的であるが、動脈硬化退縮の面では種差が生ずることを示している。マウス等の下等ほ乳動物由来の初代培養マクロファージまたは培養細胞株を用いて HDL によるコレステロール引き抜きおよび ACAT 阻害薬の作用を検討した研究は多いが、ヒト由来のマクロファージまたは細胞株を用いた報告は少ない(22, 70, 72~75)。

本章では NTE-122 のヒトにおける動脈硬化病変に対する直接的な作用を予測することを目的として、ヒト由来のマクロファージ様細胞である PMA 処理 THP-1 を用いて、NTE-122 の HDL 誘導泡沫化抑制および脱泡沫化に及ぼす作用を E5324 ならびに CI-976 と比較検討した。

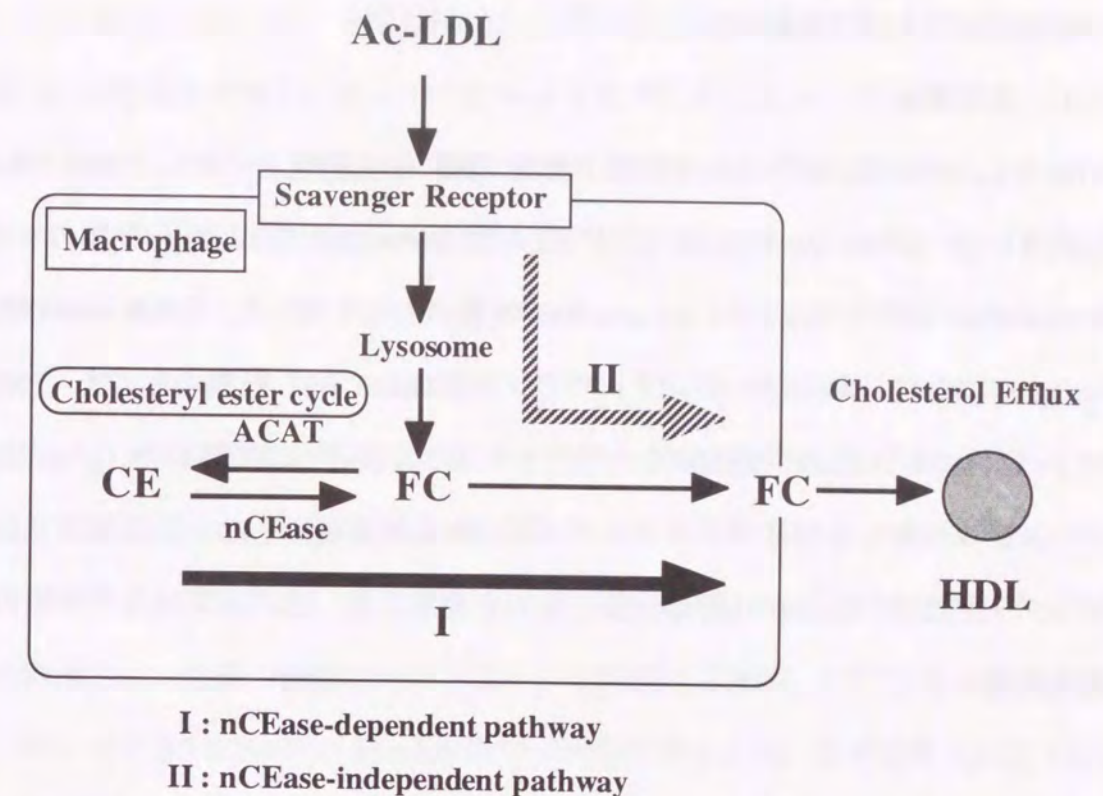


Fig. 19 Schematic diagram of the pathways for intracellular cholesterol transport in macrophages (Hakamata et al. (1995) (71)).

CE : cholesteryl esters, FC : free cholesterol, nCEase : neutral cholesterol esterase, Ac-LDL : acetylated LDL.

2. 実験材料ならびに実験方法

2. 1. 使用薬物

NTE-122, E5324 および CI-976 は日清食品 (株) 中央研究所において合成されたものを使用した。LPDS, Ac-LDL ならびに HDL は Biomedical Technology 社製のものを, FBS は Filtron 社製または PAA Laboratories 社製のものをを用いた。RPMI 1640 培地, PBS(-), ペニシリンおよびストレプトマイシンは Gibco BRL 社製のものを, PMA および *p*-ヒドロキシフェニル酢酸はナカライテスク社製のものをを用いた。コレステロールエステラーゼならびにペルオキシダーゼは和光純薬製のものを, コレステロールオキシダーゼはオリエンタル酵母社製のものをを使用した。他の試薬は全て市販の特級試薬を使用した。

2. 2. 使用細胞株および培養条件

ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 は大日本製薬より購入し, 10% FBS 添加 RPMI 1640/2-ME 培地中で, 37°C, 飽和湿度および 5% CO₂ の条件下で継代培養した。

2. 3. PMA 処理 THP-1 細胞の Ac-LDL 誘導細胞コレステロール蓄積量の測定 (泡沫化抑制作用の検討)

第 1 章に記述した方法で培養用 12 well plate において PMA 処理した THP-1 細胞を PBS(-) で 3 回洗浄した後, 5% LPDS 添加 RPMI 1640/2-ME 培地 1 ml を加え, 18 時間培養した。細胞を PBS(-) で洗浄した後, HDL 存在下の場合は Ac-LDL 50 µg/ml, HDL 250 µg/ml および被験物質の DMSO 溶液 (最終 DMSO 濃度 0.1%) を含む 5% LPDS 添加 RPMI 1640/2-ME 培地 1 ml を, HDL 非存在下の場合は Ac-LDL 50 µg/ml および被験物質の DMSO 溶液 (最終 DMSO 濃度 0.1%) を含む 5% LPDS 添加 RPMI 1640/2-ME 培地 1 ml を well に加え 48 時間培養した。培養後, 細胞コレステロールエステル化活性測定 (第 1 章) の場合と同様の方法で細胞脂質を *n*-ヘキサン: イソプロピル

アルコール混液 (3:2, v/v) を用いて抽出, 蒸発乾固した後, イソプロピルアルコール 500 µl に脂質を溶解し, コレステロール定量用試料とした。コレステロールの定量は Miyazaki らの方法(72)に従い, 酵素蛍光法で実施した。脂質溶液 30 µl を総コレステロール定量用酵素液 (0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0), 0.16 U/ml コレステロールエステラーゼ, 0.16 U/ml コレステロールオキシダーゼ, 30 U/ml ペルオキシダーゼ, 5 mM タウロコール酸ナトリウム, 0.01% Triton X-100, 0.15 mg/ml *p*-ヒドロキシフェニル酢酸) または遊離コレステロール定量用酵素液 (0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0), 0.16 U/ml コレステロールオキシダーゼ, 30 U/ml ペルオキシダーゼ, 0.15 mg/ml *p*-ヒドロキシフェニル酢酸) 0.4 ml に加えた。総コレステロールの場合は 2 時間, 遊離コレステロールの場合は 1 時間, 37°C でインキュベートした。反応液に 0.5 N NaOH 0.81 ml を添加し反応を停止させ, 蛍光強度 (励起 320 nm, 測定 407 nm) を蛍光分光光度計 (F-3000: 日立製作所社製) で測定した。総コレステロールの場合はコレステリルオレイン酸で作成した検量線より, 遊離コレステロールの場合はコレステロールで作成した検量線より定量した。コレステロールエステル量は総コレステロールと遊離コレステロールの差より求めた。細胞コレステロールエステル化活性測定 (第 1 章) の場合と同様の方法で細胞タンパク質含量を測定し, 各コレステロール測定値を補正した。

2. 4. 泡沫化 PMA 処理 THP-1 細胞からの HDL 誘導コレステロール放出の測定 (脱泡沫化促進作用の検討)

培養用 12 well plate において PMA 処理した THP-1 細胞を PBS(-) で 3 回洗浄した後, 5% LPDS 添加 RPMI 1640/2-ME 培地 1 ml を加え, 18 時間培養した。細胞を PBS(-) で洗浄した後, Ac-LDL 50 µg/ml を含む 5% LPDS 添加 RPMI 1640/2-ME 培地 1 ml を well に加え 48 時間培養した。次に, 細胞を PBS(-) で洗浄した後, HDL 250 µg/ml および被験物質の DMSO 溶液 (最終 DMSO 濃度 0.1%) を含む 5% LPDS 添加 RPMI

1640/2-ME 培地 1 ml を well に加え, さらに 48 時間培養した. 培養後, PMA 処理 THP-1 の Ac-LDL 誘導細胞コレステロール蓄積量の測定の場合と同様の方法で細胞総コレステロール, 遊離コレステロールおよびコレステロールエステル含量を測定した.

2. 5. 統計処理

結果は平均値±標準誤差で表示した. 有意差検定は 2 群間の場合はまず F 検定を行い, 正規分布である場合は Student's *t*-検定で実施し, 正規分布でない場合は Aspin-Welch 法で実施した. 多群間の場合は Dunnett 法により実施した. $P<0.05$ の場合を有意差ありと判定した.

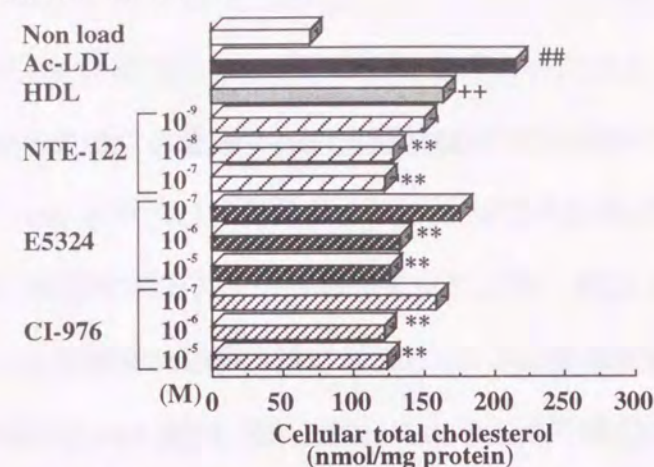
3. 実験結果

3. 1. 泡沫化抑制作用

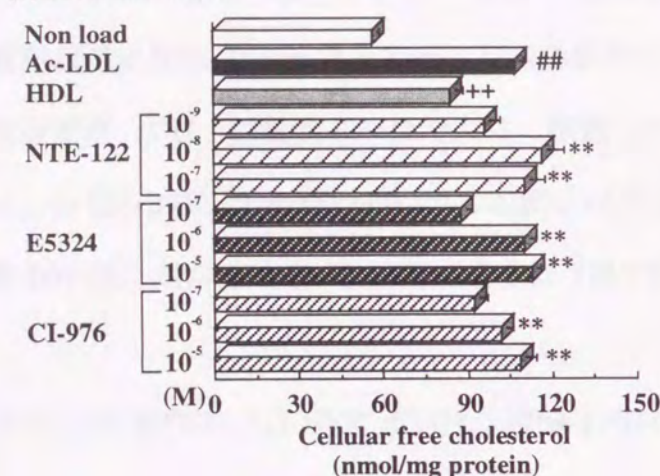
Ac-LDL および HDL の共存下で培養した PMA 処理 THP-1 細胞のコレステロール蓄積に対する NTE-122 の作用を E5324 ならびに CI-976 と比較検討した (Fig. 20). PMA 処理 THP-1 細胞のコレステロール含量, 特にコレステロールエステル含量は, 48 時間 Ac-LDL 処理することにより著明に増加した. これに対し, HDL は有意にコレステロールの蓄積を抑制し, 泡沫化抑制作用を示した. さらに, NTE-122 を共存させると, NTE-122 は 10^{-9} M 以上で HDL のコレステロール蓄積抑制作用を増強した. NTE-122 により総コレステロール含量およびコレステロールエステル含量は有意に減少した (Fig. 20 (a), (c)). 一方, 遊離コレステロール含量は, HDL 単独処理と比較して, NTE-122 の 10^{-8} M 以上において増加した (Fig. 20 (b)). NTE-122 のコレステロール蓄積抑制作用 (泡沫化抑制作用) は E5324 および CI-976 に比べ約 100 倍強力であった.

HDL 非存在下での PMA 処理 THP-1 細胞における NTE-122, E5324 および CI-976 のコレステロール蓄積に対する作用も検討した (Fig. 21). HDL 存在下の場合と同様, コレステロールエステル含量は 10^{-9} M 以上の NTE-122 により有意に減少した (Fig. 21 (c)). NTE-122 のコレステロールエステル蓄積抑制作用は E5324 および CI-976 に比べ 100~1000 倍強力であった. これに対し, 遊離コレステロール含量は NTE-122 により濃度依存的に有意に増加し, 10^{-7} M では約 1.3 倍となった (Fig. 21 (b)).

(a) Total cholesterol

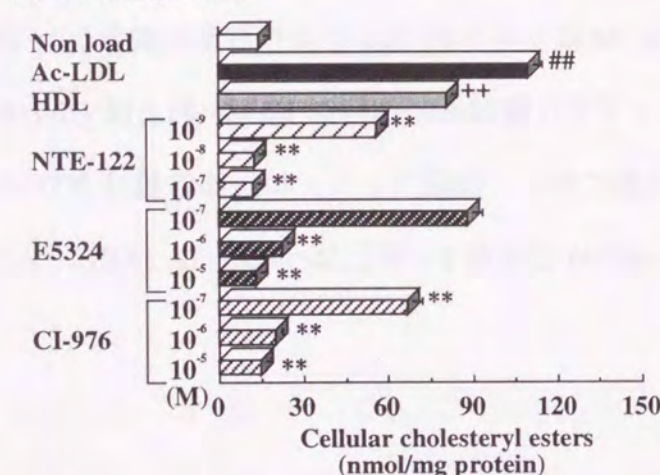


(b) Free cholesterol

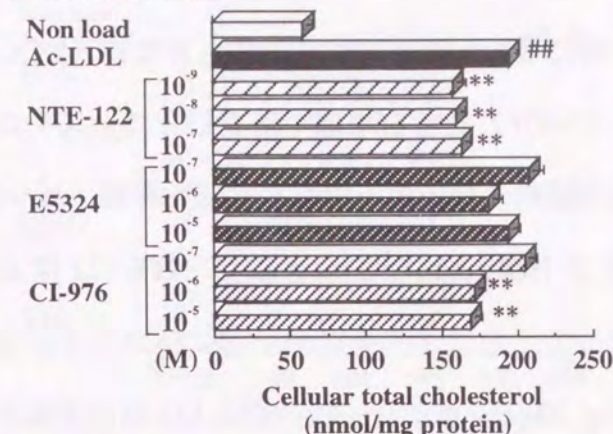


: P < 0.01 (vs Non load)
 ++ : P < 0.01 (vs Ac-LDL)
 ** : P < 0.01 (vs HDL)

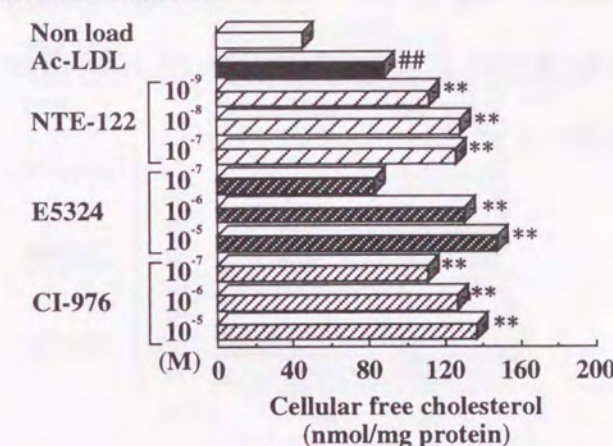
(c) Cholesteryl esters



(a) Total cholesterol



(b) Free cholesterol



: P < 0.01 (vs Non load)
 ** : P < 0.01 (vs Ac-LDL)

(c) Cholesteryl esters

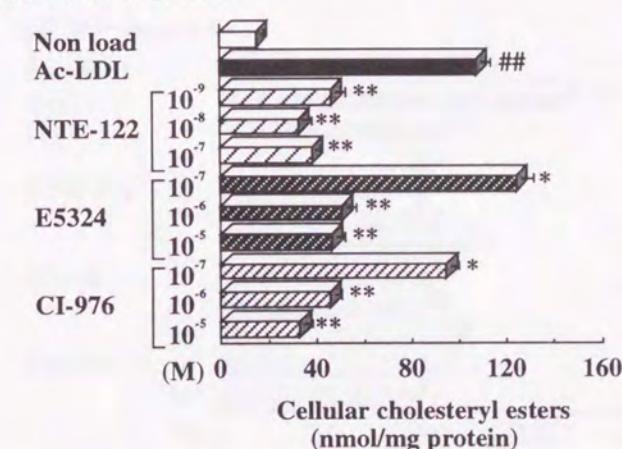


Fig. 20 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on the Ac-LDL-induced accumulation of cellular cholesterol in the presence of HDL in PMA-treated THP-1 cells; total cholesterol (a), free cholesterol (b) and cholesteryl esters (c). Each value represents the mean \pm S.E.M. (N = 3-4).

Fig. 21 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on the Ac-LDL-induced accumulation of cellular cholesterol in the absence of HDL in PMA-treated THP-1 cells; total cholesterol (a), free cholesterol (b) and cholesteryl esters (c). Each value represents the mean \pm S.E.M. (N = 3-4).

3. 2. 脱泡沫化促進作用

PMA 処理 THP-1 細胞を Ac-LDL と共に培養し泡沫細胞に変化させた後, HDL および ACAT 阻害薬 (NTE-122, E5324, CI-976) を含む培地で培養し, コレステロール含量を測定した (Fig. 22). HDL は泡沫細胞のコレステロール含量を有意に減少させ, 脱泡沫化作用が確認された. NTE-122 を HDL と共存させた場合, NTE-122 は 10^{-8} M 以上の濃度で, HDL 単独処理と比較して, 総コレステロールおよびコレステロールエステル含量をさらに減少させた (Fig. 22 (a), (c)). 一方, NTE-122 は泡沫細胞の遊離コレステロール含量を変化させなかった (Fig. 22 (b)). NTE-122 の泡沫細胞からの HDL の脱泡沫作用に対する促進作用は, E5324 および CI-976 に比べ 100~1000 倍強力であったが, 泡沫化抑制作用 (Fig. 20) に比べ弱かった.

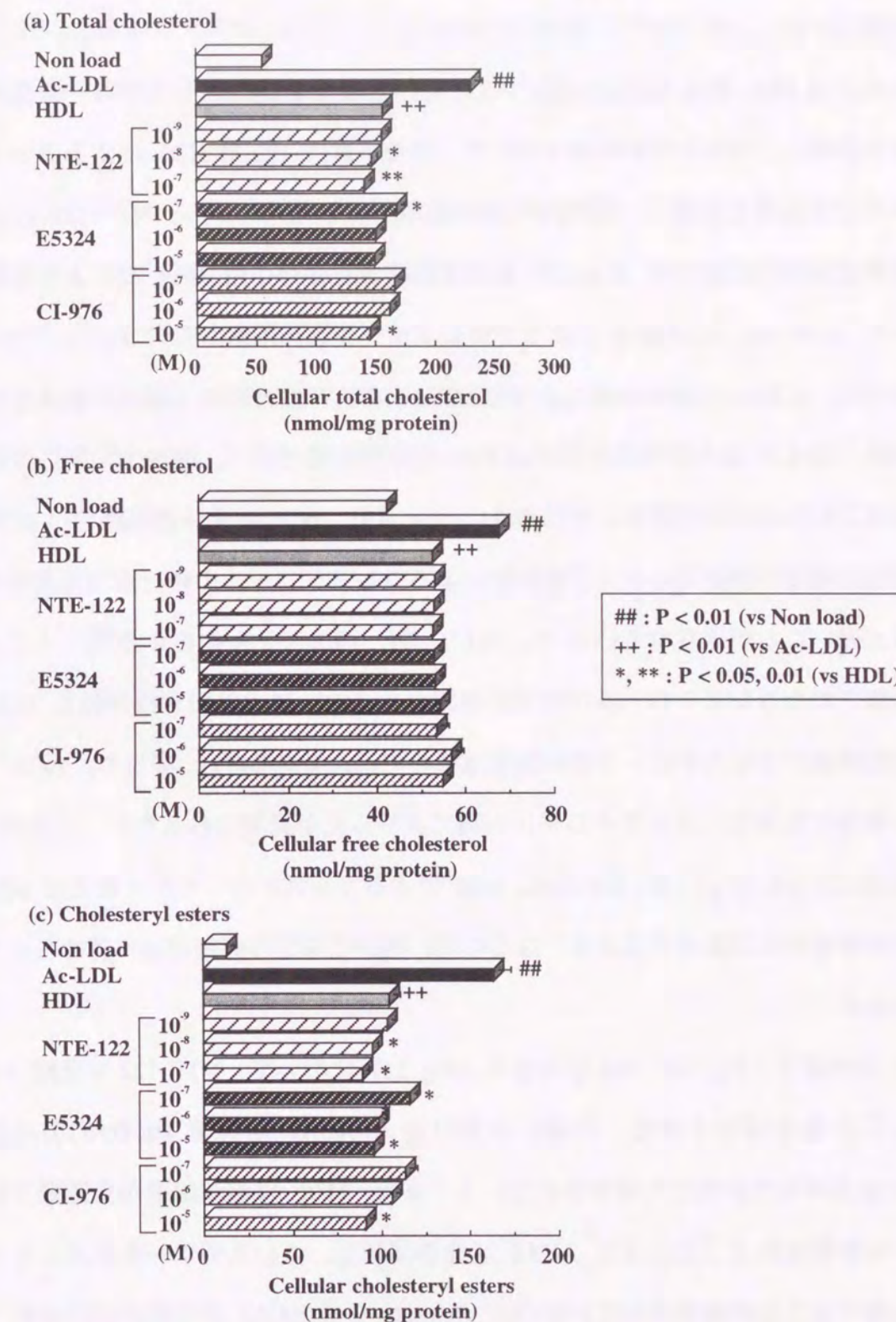


Fig. 22 Effects of NTE-122, E5324 and CI-976 on the efflux of cholesterol from pre-established foam cells converted from PMA-treated THP-1 cells in the presence of HDL; total cholesterol (a), free cholesterol (b) and cholesteryl esters (c). Each value represents the mean \pm S.E.M. (N = 4).

4. 考察

NTE-122 は HDL 存在下において、PMA 処理 THP-1 細胞のコレステロールエステル蓄積を抑制し、泡沫化抑制作用を示した。また、NTE-122 は HDL によるコレステロールの引き抜きを促進し、脱泡沫化促進作用も示した。しかし、NTE-122 のこれらの効果は泡沫化抑制作用 (Fig. 20) の方が脱泡沫化促進作用 (Fig. 22) よりも著明であった。Hakamata らは HDL によるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール引き抜きは、nCEase 依存性経路ならびに nCEase 非依存性経路の 2 種類の経路を介して行われ、HDL による脱泡沫化には nCEase 依存性経路だけが、泡沫化抑制には両経路が関与していることを報告している(71) (Fig. 19)。nCEase 依存性経路では nCEase の酵素反応速度が律速であり、この経路によるコレステロールの移行速度は高等ほ乳動物ほど遅いことが示されている(71, 74)。一方、再エステル化を介さず、リソソームで水解されたコレステロールが直接細胞膜から HDL により引き抜かれる nCEase 非依存性経路のコレステロール移行速度は極めて迅速である(71)。従って、ACAT 阻害薬が共存する場合、コレステロールの再エステル化が抑制されるため、nCEase 依存性経路は存在しなくなる。その結果、HDL によるコレステロール引き抜きは nCEase 非依存性経路のみに依存するようになるので、泡沫化抑制の促進が強く認められたと考えられる。

HDL 非存在下 (Fig. 20) および存在下 (Fig. 21) において、NTE-122 は遊離コレステロール含量を増加させた。同様の結果は他の ACAT 阻害薬 HL-004(29)および E5324(32)を用いた研究でも報告されている。また、HDL は泡沫細胞から遊離コレステロールを引き抜くことにより ACAT 活性を抑制し、コレステロールエステルの水解を促進することが報告されている(70)。Schmitz らは ACAT 阻害薬が泡沫細胞への HDL の特異的結合を増強することを示した(75)。ACAT 阻害により増加した遊離コレステロールが細胞膜へ移行し、HDL の細胞膜への特異的結合を増強する。その結果、HDL によりコレステロールが引き抜きぬかれやすくなると考えられる。

以上の成績から、NTE-122 がヒトの動脈硬化病変に直接作用し、動脈硬化の進展をより強く抑制し、さらに、退縮作用も示す可能性が示唆された。

5. 小括

NTE-122 のマクロファージの泡沫化抑制作用および脱泡沫化促進作用を PMA 処理 THP-1 細胞を用いて, *in vitro* 実験系で検討した. NTE-122 は HDL の共存下で Ac-LDL と共に培養した PMA 処理 THP-1 細胞の総コレステロール含量, 特にコレステロールエステル含量の増加 (泡沫化) を抑制した. また, NTE-122 は予め泡沫化させた PMA 処理 THP-1 細胞からの HDL によるコレステロールの引き抜き (脱泡沫化) を促進した. NTE-122 の泡沫化抑制作用は脱泡沫化促進作用に比べより強力であった. これらの結果から, NTE-122 がヒトにおいて泡沫細胞形成の抑制および泡沫細胞の退縮促進により, 抗動脈硬化作用を示し, 特により強い泡沫化抑制作用を示すことが示唆された.

第5章 コレステロール負荷動物におけるコレステロール低下作用

1. 緒言

第1～3章に記述した様に, NTE-122 は *in vitro* において強力な ACAT 活性阻害作用を示し, さらには肝細胞および小腸粘膜からの脂質分泌を抑制した. 本章では, *in vivo* での検討として, コレステロール負荷ラットを用いて, NTE-122 の5日間連続経口投与による血清および肝臓コレステロールの低下作用を他の ACAT 阻害薬, E5324 ならびに CI-976 と比較検討した. また, コレステロール負荷ラットにおける NTE-122 の単回経口投与による [14 C]コレステロール吸収抑制作用を検討した. さらに, コレステロール負荷ウサギでの8週間連続混餌投与による NTE-122 のコレステロール低下作用も検討した.

2. 実験材料ならびに実験方法

2. 1. 使用薬物

NTE-122, E5324 および CI-976 は日清食品 (株) 中央研究所において合成されたものを使用した. [14 C]コレステロール (2.0 GBq/mmol) は Amersham 社製のものを, ソルエン 350 ならびにハイオニックフローは Packard 社製のものを使用した.

2. 2. 実験動物および飼育条件

雄性 SD 系ラットは日本チャールス・リバー社 (東京) より, 雄性 JW ウサギは北山ラベス社 (長野) より購入した. 動物は室温 $23.5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$ および 12 時間明 (8～20 時): 12 時間暗 (20～8 時) の条件下で飼育し, ラットの場合は通常飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母社製) を自由摂取させ, ウサギの場合は通常飼料 RC-4 (オリエンタル酵母社製) を1日 100 g 与えて予備飼育した後, 実験に使用した.

2. 3. コレステロール負荷ラットにおけるコレステロール低下作用の検討

2. 3. 1. 試験飼育期間ならびに投与条件

雄性 SD 系ラット (180~200 g) を代謝ケージに個別に収容し、コレステロール添加飼料 (1% コレステロール, 0.5% コール酸および 5% オリーブ油添加 CRF-1) を 7 日間自由摂取させた。正常ラットには通常飼料として CRF-1 を与えた。被験物質を 5% アラビアゴム溶液に懸濁し、コレステロール負荷 3 日目より 5 日間強制経口投与した。

2. 3. 2. 血清および肝臓コレステロール含量測定

最終投与の 2 時間後、エーテル麻酔下でラットの腹大動脈より採血を行い、肝臓を摘出した。血液を 30 分間放置後、遠心分離により血清を調製した。血清の総コレステロール値 (イアトロ-MA701 T-CHO ; ヤترون社製), 遊離コレステロール値 (F-CHO 試薬 L「コクサイ」; 国際試薬製) ならびに HDL コレステロール値 (PG ポール ; ヤترون社製, イアトロ-MA701 T-CHO ; ヤترون社製) を測定した。また, 総コレステロール値と遊離コレステロール値の差よりコレステロールエステル値を求めた。摘出した肝臓はその一部を-40℃で使用時まで凍結保存した。凍結肝臓組織を解凍した後, 約 200 mg をイソプロピルアルコール 3 ml 中でガラスホモジナイザーを用いて破碎した。破碎液を 2,200×g で 15 分間遠心分離し, 上清として肝臓脂質抽出液を調製し, 総コレステロール含量および遊離コレステロール含量を各々コレステロール E-テストワコー (和光純薬製), 遊離コレステロール E-テストワコー (和光純薬製) を用いて測定し, その差よりコレステロールエステル含量を求めた。

2. 4. コレステロール負荷ラットにおける¹⁴Cコレステロール吸収に対する作用

Kusunoki(76)らの方法に準じて行った。コレステロール 60 mg および¹⁴Cコレステロール 1.85 MBq をトリオレイン 1.56 g と混合, 3.95 mg/ml コール酸ナトリウム水

溶液で全量を 20 ml に調製し, 超音波処理を行って¹⁴Cコレステロール懸濁液を調製した。雄性 SD 系ラット (200~230 g) を個別に収容し, 上記コレステロール添加飼料を 3~4 日間自由摂取させた。ラットに¹⁴Cコレステロール懸濁液 2 ml および 5% アラビアゴム溶液に懸濁した被験物質を順次強制経口投与した。¹⁴Cコレステロール投与後, 尾静脈より採血を行い, 抗凝固剤としてヘパリンナトリウムを添加後, 遠心分離により血漿を得た。血漿 50 μl をソルエン 350 およびハイオニックフローと混合し, 30 分間静置した後, 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

2. 5. コレステロール負荷ウサギにおけるコレステロール低下作用の検討

2. 5. 1. 試験飼育期間ならびに投与条件

雄性 JW ウサギ (2.3~2.7 kg) を金属ケージに個別に収容し, 通常食 (RC-4), コレステロール添加飼料 (0.25% コレステロール添加 RC-4) または各濃度の被験物質 (0.003, 0.006 および 0.012% NTE-122 : 投与量として, 1, 2 および 4 mg/kg) を添加したコレステロール添加飼料を 1 日 100 g 与え, 8 週間飼育した。

2. 5. 2. 血漿および肝臓コレステロール値測定

午前中 (9:30~10:30) に後耳介静脈より採血を行い, 抗凝固剤として EDTA を添加後, 遠心分離により血漿を得た。血漿の総コレステロール値 (イアトロ-MA701 T-CHO ; ヤترون社製), 遊離コレステロール値 (F-CHO 試薬 L「コクサイ」; 国際試薬製) ならびに HDL コレステロール値 (PG ポール ; ヤترون社製, イアトロ-MA701 T-CHO ; ヤترون社製) を測定した。また, 総コレステロール値と遊離コレステロール値の差よりコレステロールエステル値を求めた。

最終採血終了後, ウサギをペントバルビタール (30 mg/kg, i.v.) 麻酔下で頸動脈より放血致死させ, 肝臓を摘出し, その一部を-40℃で保存した。凍結した肝臓組織を解凍した後, コレステロール負荷ラットの場合と同様の方法で総コレステロール含

量，遊離コレステロール含量およびコレステロールエステル含量を測定した。

2. 6. 統計処理

結果は平均値±標準誤差で表示した。有意差検定は2群間の場合はまずF検定を行い，正規分布である場合はStudent's *t*-検定で実施し，正規分布でない場合はAspin-Welch法で実施した。多群間の場合はDunnett法により実施した。P<0.05の場合を有意差有りと判定した。

3. 実験結果

3. 1. コレステロール負荷ラットにおけるコレステロール低下作用

コレステロール負荷によりラットの血清総コレステロール値は，通常飼料飼育ラットに比べ有意に増加した（コレステロール負荷群：280.1 mg/dl，正常群：88.3 mg/dl）（Fig. 23）。また，コレステロール負荷によりラットの血清遊離コレステロール値ならびにコレステロールエステル値も通常飼料飼育ラットに比べ有意に増加した。これに対し，NTE-122は用量依存的かつ有意に血清総コレステロール，遊離コレステロールおよびコレステロールエステル値を正常ラットのレベルまで減少させた（Fig. 23 (a)~(c)）。一方，血清HDLコレステロール値はコレステロール負荷により有意に減少したが，NTE-122の投与により用量依存的に正常群のレベルまで回復した（Fig. 23 (d)）。血清総コレステロール値から求めた50%有効用量（ED₅₀値）は0.12 mg/kg/dayであった。これに対し，E5324およびCI-976のED₅₀値は各々3.5，7.0 mg/kg/dayであった（Table 9）。

肝臓総コレステロール含量はコレステロール負荷により，通常飼料飼育ラットに比べ約19倍に増加した（Fig. 24）。また，コレステロール負荷ラットでは，肝臓遊離コレステロール含量ならびにコレステロールエステル含量も通常飼料飼育ラットに比べ有意に増加した。これに対し，NTE-122は肝臓総コレステロールおよびコレステロールエステル含量を用量依存的かつ有意に減少させた。肝臓遊離コレステロール含量もNTE-122の投与により減少したが，有意な減少が認められたのは0.1 mg/kg/day以下の低用量だけであった。肝臓総コレステロール含量におけるED₅₀値は0.44 mg/kg/dayと判断された。一方，E5324およびCI-976の肝臓総コレステロール含量におけるED₅₀値は各々290，32.0 mg/kg/dayであった（Table 9）。

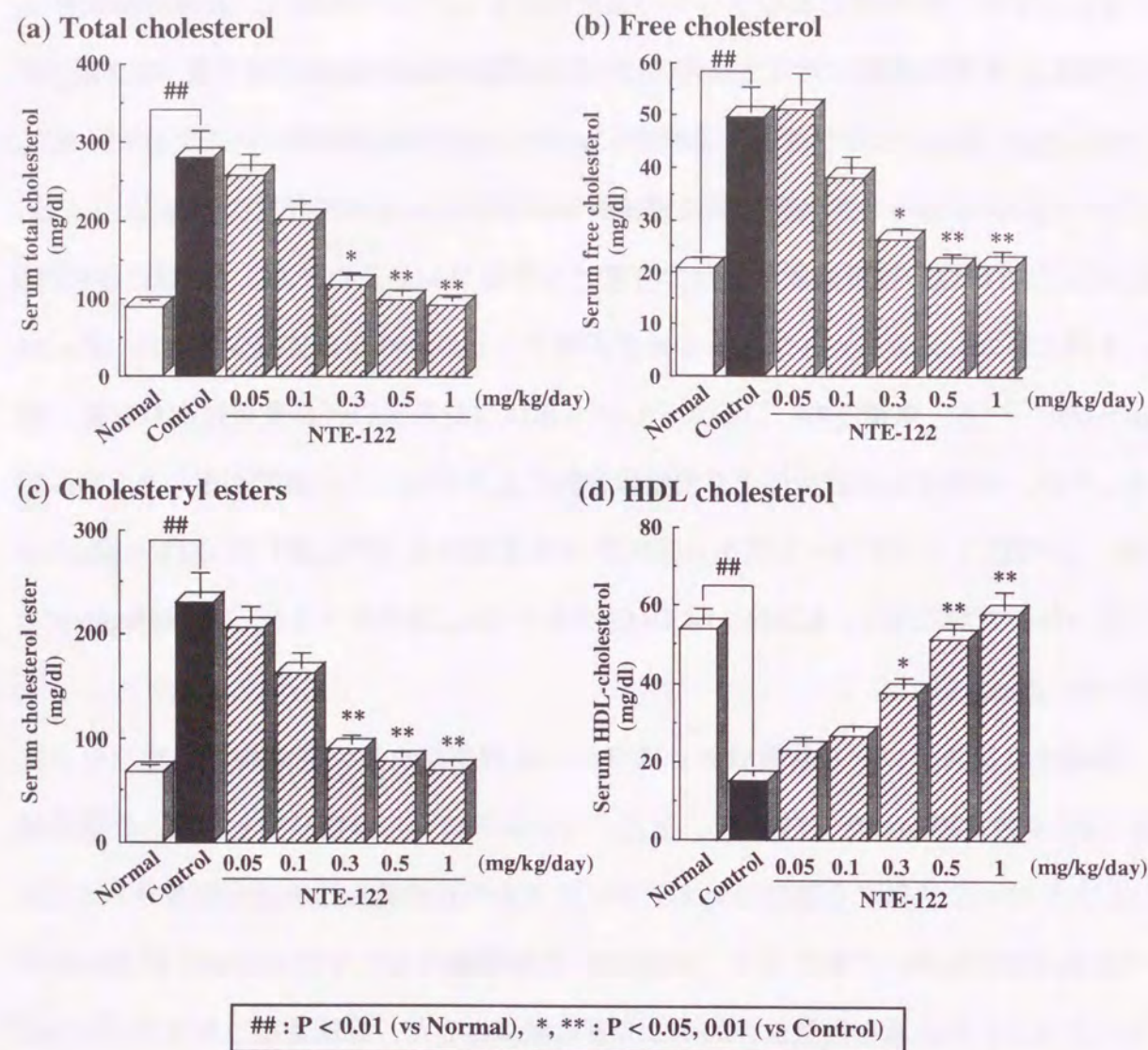


Fig. 23 Effect of NTE-122 on the levels of total cholesterol(a), free cholesterol (b), cholesteryl esters (c) and HDL cholesterol (d) in the serum of cholesterol diet-fed rats. Each value represents the mean \pm S.E.M. (N = 6-8).

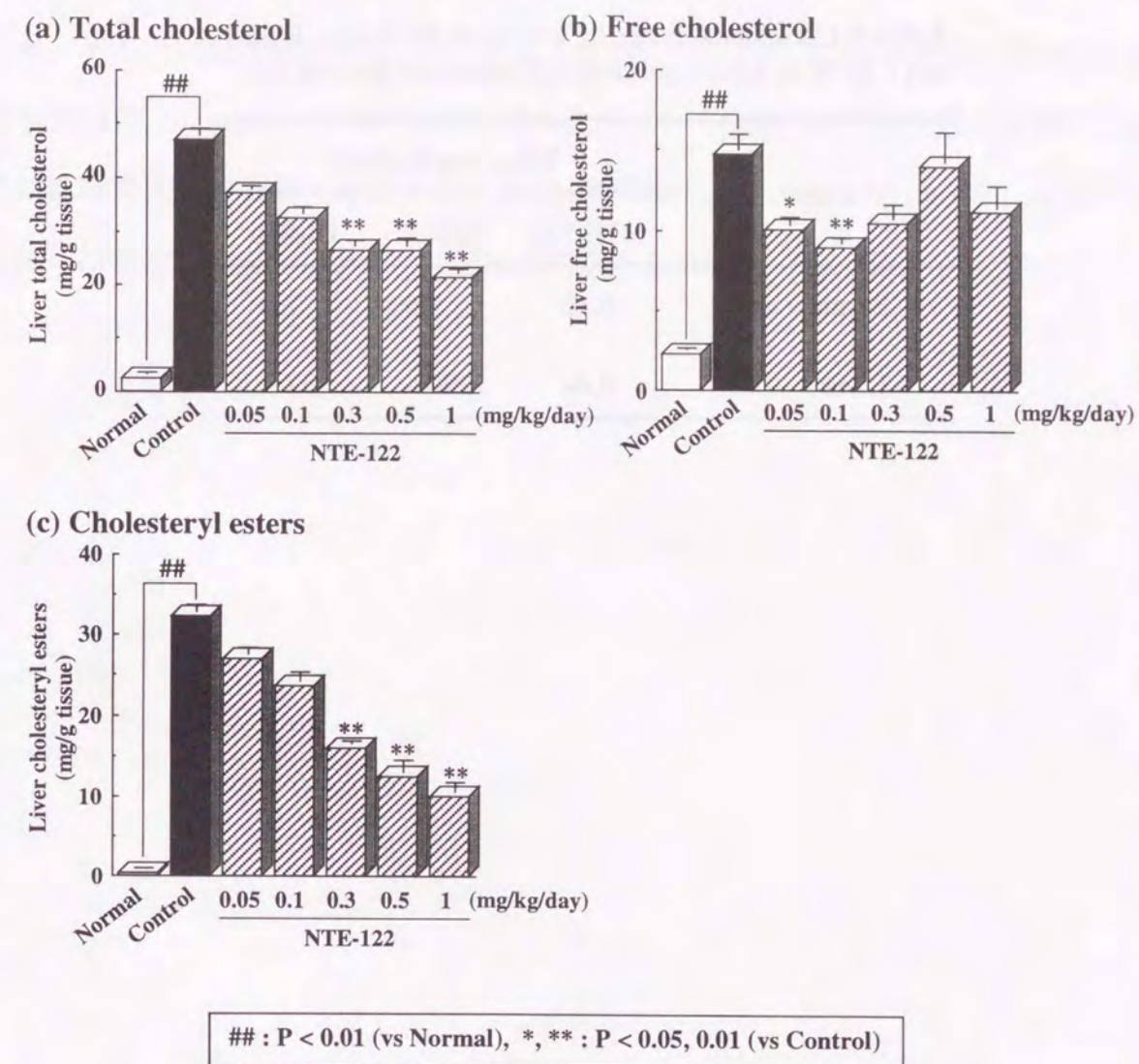


Fig. 24 Effect of NTE-122 on the contents of total cholesterol (a), free cholesterol(b) and cholesteryl esters (c) in the liver of cholesterol diet-fed rats. Each value represents the mean \pm S.E.M. (N = 6-8).

Table 9 Cholesterol-lowering effects of NTE-122, E5324 and CI-976 in serum and liver of cholesterol diet-fed rats

Tissues	ED ₅₀ (mg/kg/day)		
	NTE-122	E5324	CI-976
Serum	0.12	3.5	7.0
Liver	0.44	290	32

3. 2. コレステロール負荷ラットにおける[¹⁴C]コレステロール吸収抑制作用

[¹⁴C]コレステロール投与後、ラット血漿の放射活性は8時間後まで経時的に増加したが、その後は血漿放射活性は減少した。これに対し、[¹⁴C]コレステロール投与直前に NTE-122（1 mg/kg）を単回経口投与したラットの血漿放射活性は投与 2 時間後から 48 時間後までの間、ほぼ一定であり、対照群に比し有意に低かった。従って、NTE-122 は顕著なコレステロール吸収抑制作用を示した（Fig. 25）。



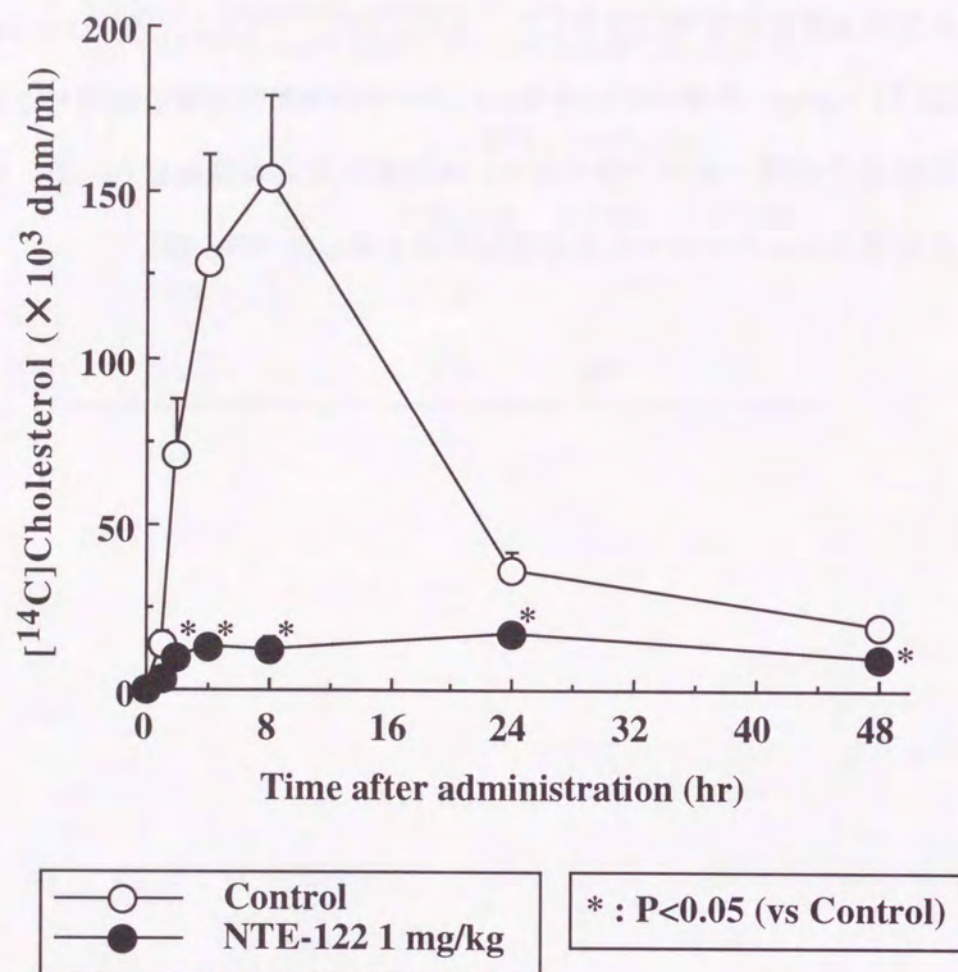


Fig. 25 Inhibitory effect of NTE-122 on the dietary [¹⁴C]cholesterol absorption in cholesterol diet-fed rats. Each value represents the mean ± S.E.M. (N = 4).

3. 3. コレステロール負荷ウサギにおけるコレステロール低下作用

コレステロール負荷期間中ウサギの血漿総コレステロール値は著明に増加した。これに対し、NTE-122 は用量依存的かつ 2 mg/kg 以上の用量において有意に血漿総コレステロール値の増加を抑制した (Fig. 26)。Table 10 に 8 週間の実験飼育終了時の血漿脂質値を示した。血漿総コレステロール値の他、遊離コレステロール値、コレステロールエステル値ならびに HDL コレステロール値の全てが、コレステロール負荷により有意に増加した。NTE-122 は用量依存的に血漿総コレステロール、遊離コレステロールおよびコレステロールエステル値を正常レベルまで低下させた。血漿 HDL コレステロール値は NTE-122 の投与により有意な変化を示さなかった。

実験終了時のウサギ肝臓総コレステロール、遊離コレステロールおよびコレステロールエステル含量を Fig. 27 に示した。コレステロール負荷により 3 種類の肝臓コレステロール含量は有意に増加したが、NTE-122 は用量依存的かつ有意にこれらを減少させた。

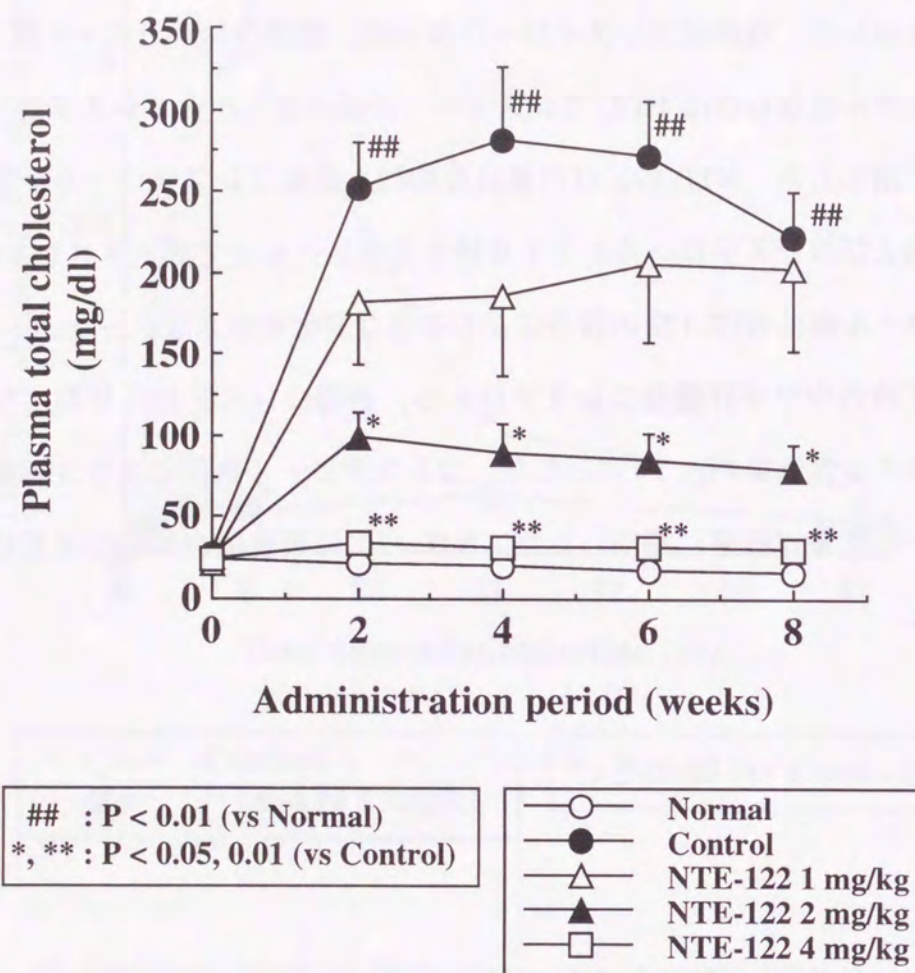


Fig. 26 Effect of NTE-122 on plasma total cholesterol level in cholesterol diet-fed rabbits. Each value represents the mean \pm S.E.M. (N = 7-8).

Table 10 Effect of NTE-122 on plasma cholesterol levels in cholesterol diet-fed rabbits

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Total cholesterol (mg/dL)	Free cholesterol (mg/dL)	Cholesteryl esters (mg/dL)	HDL cholesterol (mg/dL)
Normal		16.0 \pm 2.9	6.0 \pm 1.1	10.1 \pm 1.8	9.3 \pm 2.0
Control		221.6 \pm 28.4##	60.9 \pm 8.4##	160.7 \pm 20.2##	23.6 \pm 2.7##
NTE-122	1	202.4 \pm 51.1	55.2 \pm 17.4	147.2 \pm 33.9	17.7 \pm 1.4
	2	78.4 \pm 16.1*	19.2 \pm 3.6*	59.3 \pm 12.5*	20.9 \pm 3.2
	4	29.9 \pm 3.4**	8.5 \pm 1.0**	21.4 \pm 2.4**	18.8 \pm 1.7

Each value represents the mean \pm S.E.M. (N = 7-8). ## : Significantly different from normal, P < 0.01. *, ** : Significantly different from control, P < 0.05, P < 0.01, respectively.

4. 考察

NTE-122 はコレステロール負荷ラットおよびウサギに対し強いコレステロール低下作用を示し、その作用は *in vitro* の結果同様、他の ACAT 阻害薬、E5324 ならびに CI-976 に比べ明らかに強力であった。コレステロール負荷ラットにおいては、NTE-122 が血清総コレステロール値を減少させ、逆に血清 HDL コレステロール値を増加させたことから、NTE-122 は HDL を除く動脈硬化性リポタンパク質 (VLDL, LDL 等) のコレステロール値を強力に低下させたことが示唆された。なお、ラットの血清 HDL コレステロール値はコレステロール負荷により減少したが、この現象はウサギでは認められず、その機序についてはよく理解されていない。一般に、コレステロール負荷動物モデルでは小腸からのコレステロール吸収が直接的に高コレステロール血症を引き起こすことから、小腸 ACAT 活性の阻害によりコレステロール低下作用が示される(21, 32)。Sakuma らは経口非吸収性の ACAT 阻害薬 FR129169 が体内へのコレステロール吸収量を低下させることにより、肝臓の ACAT 活性およびコレステロール含量を低下させたことを報告している(77)。これらの報告を考え合わせると、NTE-122 は小腸 ACAT 活性阻害によりコレステロール吸収を抑制することで血清ならびに肝臓コレステロールを低下させたと考えられる。実際、NTE-122 はラットにおける [^{14}C] コレステロール吸収を有意に抑制した (Fig. 25)。他の ACAT 阻害薬である F-1394(76), FY-087(78)および YM-17E(24)は [^{14}C] コレステロール吸収を抑制するためには 30 mg/kg の用量を必要とし、さらにその有意なコレステロール吸収抑制作用は、NTE-122 の様に長時間持続しなかった。従って、NTE-122 は臨床使用した際に他の ACAT 阻害薬より強力かつ持続性に優れている可能性が考えられる。しかし、NTE-122 のラット肝臓コレステロール低下作用において、総コレステロールおよびコレステロールエステル含量は用量依存的に低下したのに対し、遊離コレステロール含量は用量依存的な低下を示さなかった。しかも、有意な肝臓遊離コレステロール低下作用を示したのは 0.1 mg/kg/day 以下の低用量だけであった (Fig. 24)。これは NTE-122 が 0.1 mg/kg/day

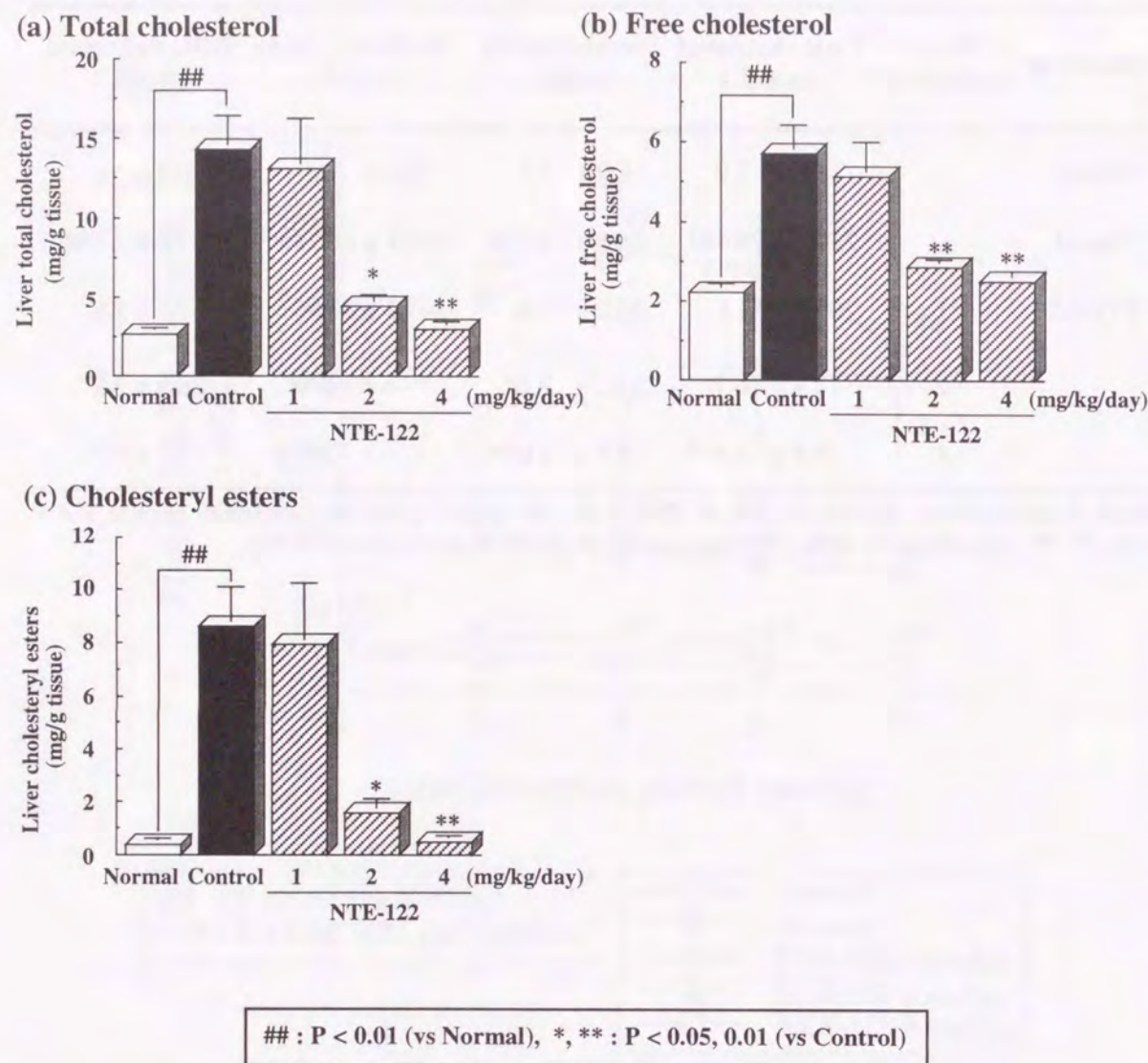


Fig. 27 Effect of NTE-122 on the contents of total cholesterol (a), free cholesterol (b) and cholesteryl esters (c) in the liver of cholesterol diet-fed rabbits. Each value represents the mean \pm S.E.M. (N = 7-8).

以下の場合、NTE-122 の肝臓 ACAT 活性阻害作用に比べて小腸のコレステロール吸収阻害作用が強く発現し、その結果、肝臓の総コレステロール、遊離コレステロールおよびコレステロールエステルのすべてが低下した可能性が考えられる。これに対し、NTE-122 が 0.3 mg/kg/day 以上の場合、小腸のコレステロール吸収阻害作用に比べ肝臓 ACAT 活性阻害作用が強く現れたため、肝臓コレステロールエステル含量の低下に伴って、相対的に遊離コレステロール含量が増加したことが考えられる。その結果として肝臓総コレステロールおよびコレステロールエステル含量の有意な低下に比し、遊離コレステロール含量の有意な低下がみられなくなったと推察された。従って、NTE-122 はコレステロール負荷ラットにおいて、小腸からのコレステロール吸収抑制だけでなく肝臓におけるコレステロール代謝にも作用してコレステロール低下作用を示すことが示唆された。

一方、コレステロール負荷ウサギの場合はラットの結果と異なり、NTE-122 による総コレステロール、遊離コレステロールおよびコレステロールエステルの低下は、血漿と肝臓においてほぼ同じ用量反応性を示した。これらの結果から、ウサギ肝臓における NTE-122 のコレステロール低下作用は直接的な作用ではなく、小腸からのコレステロール吸収抑制の二次的な作用であることが推察される。Matsuo らもコレステロール負荷ウサギにおける ACAT 阻害薬 FR145237 の作用において同様のことを報告している(79)。さらに、NTE-122 がラットおよびウサギ肝臓 ACAT 活性に対しほぼ同程度の阻害作用を示した（第 1 章、Table 2 参照）のに対し、両種の肝臓遊離コレステロール含量に対する NTE-122 の作用が異なっていたことは、両種間での NTE-122 の生物利用性（吸収・分布・代謝）、または食餌性高コレステロール血症における肝臓 ACAT の寄与の違いを反映したものと考えられる。

5. 小括

NTE-122 の *in vivo* におけるコレステロール低下作用をコレステロール負荷ラットおよびコレステロール負荷ウサギを用いて検討した。その結果、コレステロール負荷ラットにおいて、NTE-122 は小腸の ACAT を阻害することにより、コレステロールの吸収を抑制すると同時に、肝臓においても ACAT 阻害作用を示していることが示唆された。一方、コレステロール負荷ウサギにおいても NTE-122 は強力なコレステロール低下作用を示したが、ラットの場合とは異なり、小腸からのコレステロール吸収の阻害に大きく依存していることが考えられる。

結 論

新規 ACAT 阻害薬 NTE-122 (26) のコレステロール代謝に対する薬理学的特性の解明を目的として無細胞, 培養細胞および実験動物レベルで検討し, 以下の知見を得た.

- 1) NTE-122 はヒト培養細胞 (HepG2 細胞, CaCo-2 細胞, PMA 処理 THP-1 細胞), ウサギ臓器 (肝臓, 小腸, 大動脈), ラット臓器 (肝臓, 小腸), マウス臓器 (肝臓) ならびにマウスマクロファージ細胞 (J774.1 細胞) のミクロソーム ACAT 活性を $8.8 \times 10^{-10} \sim 3.6 \times 10^{-7}$ M の IC_{50} 値で抑制した. 特に, ACAT-1 のみが発現していると考えられるマクロファージおよび大動脈では, NTE-122 の阻害作用はマウスやウサギに比べヒト (PMA 処理 THP-1 細胞) においてより強力であった. また, その阻害様式は競合的拮抗阻害であった. NTE-122 はヒト培養細胞 (HepG2 細胞, CaCo-2 細胞, PMA 処理 THP-1 細胞) の細胞コレステロールエステル化活性を $3.5 \sim 6.0 \times 10^{-9}$ M の IC_{50} 値で抑制し, ラット腹腔マクロファージおよびマウス J774.1 細胞に対する作用よりも強かった. 従って, ACAT-1 においては, NTE-122 はヒト ACAT-1 をより強く阻害することが細胞レベルでも確認された. 一方, NTE-122 は他の脂質代謝関連酵素 (HMG-CoA 還元酵素, アシル CoA 合成酵素, aCEase, nCEase, LCAT, AGAT, コレステロール 7α -水酸化酵素) ならびに HepG2 細胞のコレステロール生合成に対し, 10^{-5} M までほとんど阻害作用を示さず, TG および PL 生合成に対しても細胞コレステロールエステル化活性を完全に阻害した濃度 (10^{-7} M) で影響を与えなかった. これらのことから, NTE-122 は ACAT を選択的に阻害することが示された.
- 2) NTE-122 は 25-ヒドロキシコレステロール処理 HepG2 細胞のコレステロールエステル, TG およびアポ B の分泌を濃度依存的に阻害した. これらの結果から,

本化合物が肝細胞の ACAT を阻害することにより, 肝細胞から分泌されるアポ B 含有リポタンパク質 (VLDL) 中のコレステロールエステル含量およびアポ B 含有リポタンパク質分泌量を低下させることが示唆された. また, NTE-122 は HepG2 細胞の胆汁酸分泌を 10^{-8} M 以上の濃度で増加させた. この結果より, 本化合物が ACAT 阻害により肝細胞中で増加した遊離コレステロールからの胆汁酸の合成を亢進し, 胆汁を介したコレステロールの体外への排泄を促進することが示唆された. 以上の成績から, NTE-122 は肝臓 ACAT 阻害により肝臓からのコレステロール分泌量を減少させ, また, 二次的に胆汁分泌を増加させることによりコレステロール低下作用を示す可能性が考えられた.

- 3) NTE-122 はメンブレンフィルター上に培養した CaCo-2 細胞の漿膜側へのコレステロールエステルおよび TG 分泌を濃度依存的かつ 10^{-8} M 以上で有意に阻害した. 以上の結果から, 本化合物が小腸粘膜の ACAT を阻害することにより小腸粘膜から分泌されるカイロミクロンのコレステロール含量およびカイロミクロンの分泌量を減少させ, 小腸からのコレステロール吸収を抑制することが示唆された.
- 4) NTE-122 は HDL 存在下および非存在下での Ac-LDL による PMA 処理 THP-1 細胞の泡沫化 (コレステロールエステル蓄積) を 10^{-9} M 以上で有意に抑制した. また, Ac-LDL により予め泡沫化させた PMA 処理 THP-1 細胞からの HDL による脱泡沫化作用を 10^{-8} M 以上で有意に促進した. これらの結果から, 本化合物が動脈硬化病変に直接作用して, 動脈硬化病変の進展を抑制し, さらに退縮させる可能性が考えられた.
- 5) NTE-122 をコレステロール負荷ラットに 5 日間連続経口投与した場合, 血清総

コレステロール値および肝臓総コレステロール含量を各々 0.12, 0.44 mg/kg/day の ED₅₀ 値で低下させた。また、このときの肝臓遊離コレステロール含量の動態から、肝臓における NTE-122 の ACAT 阻害が推察された。NTE-122 がコレステロール負荷ラットの [¹⁴C]コレステロール吸収を 1 mg/kg の単回経口投与により、強力に阻害したことから、本化合物が小腸のコレステロール吸収を抑制することが示唆された。また、本化合物はコレステロール負荷ウサギにおいても強力なコレステロール低下作用を示した。

以上、NTE-122 は肝臓、小腸およびマクロファージ等の ACAT 活性を強力かつ選択的、拮抗的に阻害し、小腸からのコレステロール吸収および肝臓からの VLDL を介したコレステロール分泌を抑制すると共に、肝臓からの胆汁酸排泄を促進することによって強力なコレステロール低下作用を示すことが考えられた。また、NTE-122 のマクロファージ ACAT 活性阻害作用は実験動物に比しヒトにおいてより強力であり、本化合物はコレステロール低下作用によって動脈硬化症のリスクを低減させるだけでなく、血管壁に直接作用することによって動脈硬化病変の進展抑制ならびに退縮作用を示す新規な高脂血症治療薬として効果を発揮する可能性が明らかとなった。

参考文献

- 1) Warner, G. J., Stoudt, G., Bamberger, M., Johnson, W. J. and Rothblat, G. H.: Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5772-5778 (1995)
- 2) Chang, T. Y., Chang, C. C. Y. and Cheng, D.: Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Ann. Rev. Biochem.*, **66**, 613-638 (1997)
- 3) Brown, M. S., Kovanen, P. T. and Goldstein, J. L.: Receptor-mediated uptake of lipoprotein cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog. Hormone Res.*, **35**, 215-258 (1979)
- 4) Chang, C. C. Y., Huh, H. Y., Cadigen, K. M. and Chang, T. Y.: Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20747-20755 (1993)
- 5) Uelmen, P. J., Oka, K., Sullivan, M., Chang, C. Y., Chang, T. Y. and Chan, L.: Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26192-26201 (1995)
- 6) Cao, G., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. : Complementation of mutation in acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) fails to restore sterol regulation in ACAT-defective sterol-resistant hamster cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14642-14648 (1996)
- 7) Matsuda, H., Hakamata, H., Kawasaki, T., Sakashita, N., Miyazaki, A., Takahashi, K., Shichiri, M. and Horiuchi, S.: Molecular cloning, functional expression and tissue distribution of rat acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1391**, 193-203 (1998)
- 8) Pape, M. E., Schultz, P. A., Rea, T. J., DeMattos, R. B., Kieft, K., Bisgaier, C. L., Newton, R. S. and Krause, B. R.: Tissue specific changes in acyl-CoA: cholesterol acyltransferase

- (ACAT) mRNA levels in rabbits. *J. Lipid Res.*, **36**, 823-838 (1995)
- 9) Meiner, V. L., Cases, S., Myers, H. M., Sande, E. R., Bellosta, S., Schambelan, M. S., Pitas, R. E., McGuire, J., Herz, J. and Farese, R. V. Jr.: Disruption of the acyl-CoA: cholesterol acyltransferase gene in mice: Evidence suggesting multiple cholesterol esterification enzymes in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 14041-14046 (1996)
 - 11) Oelkers, P., Behari, A., Cromley, D., Billhimer, J. T. and Sturley, S. T.: Characterization of two human genes encoding acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase-related enzymes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26765-26771 (1998)
 - 12) Anderson, R. A., Joyce, C., Davis, M., Reagan, J. W., Clark, M., Shelness, G. S. and Rudel, L. L.: Identification of a form of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26747-26754 (1998)
 - 13) Cases, S., Novak, S., Zheng, Y. W., Myers, H. M., Lear, S. R., Sande, E., Welch, C. B., Lusis, A. J., Spencer, T. A., Krause, B. R., Erickson, S. K. and Farese, R. V. Jr.: ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA: cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26755-26764 (1998)
 - 13) Meiner, V., Tam, C., Gunn, M. D., Dong, L-M., Weisgraber, K. H., Novak, S., Myers, H. M., Erickson, S. K. and Farese, R. V. Jr.: Tissue expression studies on the mouse acyl-CoA: cholesterol acyltransferase gene (*Acat*): findings supporting the existence of multiple cholesterol esterification enzyme in mice. *J. Lipid Res.*, **38**, 1928-1933 (1997)
 - 14) Lee, O., Chang, C. C. Y., Lee, W. and Chang, T-Y.: Immunodepletion experiments suggest that acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) protein plays a major catalytic role in adult human liver, adrenal gland, macrophages, and kidney, but not in intestines. *J. Lipid Res.*, **39**, 1722-1727 (1998)
 - 15) 厚生省: 平成9年度厚生白書, (1997)
 - 16) 日本動脈硬化学会高脂血症診断ガイドライン検討委員会: 高脂血症診断ガイドライン. 動脈硬化., **25**, 1-34 (1997)
 - 17) Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. and Witztum, J. L.: Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New. Engl. J. Med.*, **320**, 915-924 (1989)
 - 18) Sliskovic, D. R. and White, A. D.: Therapeutic potential of ACAT inhibitors as lipid lowering and anti-atherosclerotic agents. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **12**, 194-199 (1991)
 - 19) 下津秀則: 脂質低下剤の現況と展望. “分子リピドロギー” (森崎信尋編), メジカルセンス, p133-p139 (1997)
 - 20) Ross, A. C., Go, K. J., Heider, J. G. and Rothblat, G. H.: Selective inhibition of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase by compound 58-035. *J. Biol. Chem.*, **259**, 815-819 (1984)
 - 21) Krause, B. R., Anderson, M., Bisgaier, C. L., Bocan, T., Bousley, R., Dehart, P., Essenburg, A., Hamelehle, K., Homan, R., Kieft, K., McNally, W., Stanfield, R. and Newton, R. S.: In vivo evidence that the lipid-regulating activity of the ACAT inhibitor CI-976 in rats is due to inhibition of both intestinal and liver ACAT. *J. Lipid Res.*, **34**, 279-294 (1993)
 - 22) Murakami, S., Yamagishi, I., Asami, Y., Sato, M. and Tomisawa, K.: Effect of the ACAT inhibitor, HL-004, on cholesterol metabolism in macrophages. *Cell Mol. Biol.*, **42**, 865-872 (1996)
 - 23) Largis, E. F., Wang, C. H., DeVeries, V. G. and Schaffer, S. A.: CL277,082: a novel inhibitor of ACAT-catalyzed cholesterol esterification and cholesterol absorption. *J. Lipid Res.*, **30**, 681-690 (1989)
 - 24) Kashiwa, M., Masuyama, Y., Miyauchi, H., Uchida, T., Naganuma, S., Kakuta, H., Terada, M., Kiriyama, T., Matsuda, K., Ito, N., Izumi, Y. and Takenaka, T.: Pharmacological properties of YM17E, an acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor, and diarrheal

- effect in beagle dogs. *Jpn. J. Pharmacol.*, **73**, 41-50 (1997)
- 25) Kogushi, M., Tanaka, H., Kobayashi, H., Yamada, T., Ohtsuka, I., Kimura, T. and Saito, I.: Effect of E5324, a novel inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, on cholesteryl ester synthesis and accumulation in macrophages. *Jpn. J. Pharmacol.*, **68**, 191-199 (1995)
- 26) 山田敏広, 高木一成, 小林和浩, 田中政春, 小幡圭亮, 池本清人, 信原陽一, 山崎眞宏: 脂環式炭化水素含有ウレア誘導体の合成とコレステロール低下作用. 日本薬学会第 116 年会講演要旨集, p255 (11-4) (1996)
- 27) Lowry, O. H., Rowbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 28) Heider, J. G., Pickens, C. E. and Kelly, L. A.: Role of acyl CoA: cholesterol acyltransferase in cholesterol absorption and its inhibition by 57-118 in the rabbit. *J. Lipid Res.*, **22**, 271-277 (1983)
- 29) 興 貴美子: “細胞トキシコロジー試験法”(日本組織培養学会編), 朝倉書店. p189-p198 (1991)
- 30) Salisbury, B. G., Davis, H. R., Burrier, R. E., Burnett, D. A., Boykow, G., Caplen, M. A., Clemmons, A. L., Compton, D. S., Hools, L. M., McGregor, D. G., Schnitzer-Polokoff, R., Smith, A. A., Weig, B. C., Zilli, D. L., Clader, J. W. and Sybertz, E. J.: Hypocholesterolemic activity of a novel inhibitor of cholesterol absorption, SCH 48461. *Atherosclerosis*, **115**, 45-63 (1995)
- 31) Field, F. J., Albright, E. and Mathur, S. N.: Regulation of cholesterol esterification by micellar cholesterol in CaCo-2 cells. *J. Lipid Res.*, **28**, 1057-1066 (1987)
- 32) Kaneko, I., Hazama-Shimada, Y. and Endo, A.: Inhibitory effects on lipid metabolism in cultured cells of ML-236B, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase. *Eur. J. Biochem.*, **87**, 313-321 (1978)

- 33) Banis, R. J. and Tove, S. B.: Solubilization of a long chain fatty acyl-CoA synthetase from chicken adipose tissue microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **348**, 210-220 (1974)
- 34) Liza, M., Romero, J. R., Chico, Y., Fresnedo, O. and Ochoa, B.: Application of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the assay of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase and neutral and acid cholesterol ester hydrolase. *Lipids*, **31**, 323-329 (1996)
- 35) Kuroda, K., Yoshida, M., Uosaki, Y., Ando, K., Kawamoto, I., Oishi, E., Onuma, H., Yamada, K. and Matsuda, Y.: AS-183, a novel inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Scedosporium* sp. SPC-15549. *J. Antibiotics (Tokyo)*, **46**, 1196-1202 (1993)
- 36) 高橋慶一: 続生化学実験講座 3「膜脂質と血漿リポタンパク質・下」(日本生化学会編), 東京化学同人. p652-p655 (1986)
- 37) Yamashita, S. and Numa, S.: Partial purification and properties of glycerophosphate acyltransferase from rat liver. *Eur. J. Biochem.*, **31**, 565-573 (1972)
- 38) Nagata, Y., Hidaka, Y., Ishida, F. and Kamei, T.: Effect of Simvastatin (MK-733) on the regulation of cholesterol synthesis in HepG2 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 843-850 (1990)
- 39) Kinnunen, P. M., DeMichele, A. and Lange, L. G.: Chemical modification of acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase subtypes by differential diethyl pyrocarbonate sensitivity. *Biochemistry.*, **27**, 7344-7350 (1988)
- 40) Kawasaki, T., Miyazaki, A., Hakamata, H., Matsuda, H. and Horiuchi, S.: Biochemical evidence of oligomerization of rat adrenal acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**, 347-352 (1998)
- 41) Fungwe, T. V., Cagen, L., Wilcox, H. G. and Heimberg, M.: Regulation of hepatic secretion of very low density lipoprotein by dietary cholesterol. *J. Lipid Res.*, **33**, 179-191 (1992)

- 42) Drevon, C. A., Engehorn, S. C. and Steinberg, D.: Secretion of very low density lipoproteins enriched on cholesterol esters by cultured rat hepatocytes during stimulation of intracellular cholesterol esterification. *J. Lipid Res.*, **21**, 1065-1071 (1980)
- 43) Miller, J. P.: Cardiovascular disease and hyperlipidemia. *Curr. Opin. Lipidol.*, **6**, U15-U19 (1995)
- 44) Boström, K., Boré, J., Wettsten, M., Sjöberg, A., Bondjers, G., Wiklund, O., Carlsson, P. and Olofsson, S.-O.: Studies on the assembly of apoB-100-containing lipoproteins in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4434-4442 (1988)
- 45) Dixon, J. L. and Ginsberg, H. N.: Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J. Lipid Res.*, **34**, 167-179 (1993)
- 46) Wu, X., Sakata, N., Dixon, J. and Ginsberg, H. N.: Evidence for a lack of regulation of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoprotein from HepG2 cells by cholesteryl ester. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12375-12382 (1994)
- 47) Craig, W. Y., Nutik, R. and Cooper, A. D.: Regulation of apolipoprotein synthesis and secretion in the human hepatoma HepG2. *J. Biol. Chem.*, **263**, 13880-13890 (1988)
- 48) Dashti, N.: The effect of low density lipoproteins, cholesterol, and 25-hydroxycholesterol on apolipoprotein B gene expression in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 7160-7169 (1992)
- 49) Davis, R. A., McNeal, M. M. and Moses, R. L.: Intrahepatic assembly of very low density lipoprotein. Competition by cholesterol ester for the hydrophobic core. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2634-2640 (1982)
- 50) Noel, S. P., Wong, L., Dolphin, P. J., Dory, L. and Rubenstein, D.: Secretion of cholesterol-rich lipoproteins by perfused liver of hypercholesterolemic rats. *J. Clin. Invest.*, **64**, 674-683 (1979)

- 51) Krause, B. R., Bousely, R. F., Kieft, K. A. and Stanfield, R. L.: Effect of the ACAT inhibitor CI-976 on plasma cholesterol concentrations and distribution in hamsters fed zero- and low-cholesterol diet. *Clin. Biochem.*, **25**, 371-377 (1992)
- 52) Musanti, R., Giorgini, L., Lovisolo, P., Pirillo, A., Chiari, A. and Ghiselli, G.: Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase decreases apolipoprotein B-100-containing lipoprotein secretion from HepG2 cells. *J. Lipid Res.*, **37**, 1-14 (1996)
- 53) Graham, A., Wood, J. L. and Russell, L. J.: Cholesterol esterification is not essential for secretion of lipoprotein components by HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1302**, 46-54 (1996)
- 54) Dietschy, J. M., Turley, S. D. and Spady, D. K.: Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res.*, **34**, 1637-1659 (1993)
- 55) Nestel, P. J. and Billington, T.: Effects of probucol on low density lipoprotein removal and high density lipoprotein synthesis. *Atherosclerosis*, **38**, 203-209 (1981)
- 56) Sampson, W. J., Suffolk, R. A., Bowers, P., Houghton, J. D., Botham, K. M. and Suckling, K. E.: The role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in the metabolism of free cholesterol to cholesteryl esters or bile acids in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **920**, 1-8 (1987)
- 57) Murakami, S., Yamagishi, I., Sato, M., Tomisawa, K., Nara, Y. and Yamori, Y.: ACAT inhibitor HL-004 accelerates the regression of hypercholesterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP): stimulation of bile acid production by HL-004. *Atherosclerosis*, **133**, 97-104 (1997)
- 58) Yanagita, T., Sonda, K., Yamamoto, K., Yotsumoto, H., Nunez, J. H. and Murakami, S.: Effect of a new acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor, HL-004, on cholesterol esterification and lipid metabolism in HepG2 cells. *Curr. Ther. Res.*, **56**, 787-

- 59) Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959)
- 60) Forte, M. Y., McCall, R. M., Knowles, B. B. and Shore, G. V.: Isolation and characterization of lipoproteins produced by human hepatoma-derived cell lines other than HepG2. *J. Lipid Res.*, **30**, 817-829 (1989)
- 61) Cianflone, K. M., Yasruel, Z., Rodriguez, M. A., Vas, D. and Sniderman, A. D.: Regulation of apoB secretion from HepG2 cells: evidence for a critical role for cholesteryl ester synthesis in the response to a fatty acid challenge. *J. Lipid Res.*, **31**, 2045-2055 (1990)
- 62) Pullinger, C. R., North, J. D., Teng, B. B., Rifici, V. A., Ronhild de Brito, A. E. and Scott, J.: The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2 cells; regulation of secretion by oleic acid, albumin, and insulin, and measurement of the mRNA half-life. *J. Lipid Res.*, **30**, 1065-1077 (1989)
- 63) Suckling, K. E. and Stange, E. F.: Role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J. Lipid Res.*, **26**, 647-671 (1985)
- 64) Field, F. J., Albright, E. and Mathur, S. N.: Inhibition of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity by PD128042: effect on cholesterol metabolism and secretion in CaCo-2 cells. *Lipids*, **26**, 1-8 (1991)
- 65) van Greevenbroek, M. M., Robertus-Teunissen, M. G., Erkelens, D. W., de Bruin, T. W.: Participation of the microsomal triglyceride transfer protein in lipoprotein assembly in CaCo-2 cells: interaction with saturated and unsaturated dietary fatty acids. *J. Lipid Res.*, **39**, 173-85 (1998)
- 66) Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **362**, 801-809 (1993)

- 67) Faggiotto, A., Ross, R. and Hafker, L.: Studies on hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. changes that lead to fatty formation. *Atherosclerosis*, **4**, 323-340 (1984)
- 68) Schaffner, T., Taylor, K., Bantucci, E. J., Fischer-Dzoga, K., Beeson, J. H., Glagov, S. and Wissler, R.: Arterial foam cells with distinctive immunomorphologic and histochemical features of macrophages. *Am. J. Pathol.*, **100**, 57-80 (1980)
- 69) Krieger, M. and Herz, J.: Structures and functions of multiligand and lipoprotein receptors. *Ann. Rev. Biochem.*, **63**, 601-637 (1994)
- 70) Brown, M. S., Ho, Y. K. and Goldstein, J. L.: The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells: continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J. Biol. Chem.*, **255**, 9344-9352 (1980)
- 71) Hakamata, H., Miyazaki, A., Sakai, M., Sakamoto, Y., Matsuda, H., Kihara, K. and Horiuchi, S.: Differential effects of an acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor on HDL-induced cholesterol efflux from rat macrophage foam cells. *FEBS Lett.*, **363**, 29-32 (1995)
- 72) Miyazaki, A., Sakai, M., Yamaguchi, E., Sakamoto, Y., Shichiri, M. and Horiuchi, S.: Two independent macrophage receptors for acetylated high-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1170**, 143-150 (1993)
- 73) Miyazaki, A., Sakai, M., Sugihara, Y., Hakamata, H., Sakamoto, Y., Morikawa, W. and Horiuchi, S.: Acetylated low density lipoprotein reduces its ligand activity for the scavenger receptor after interaction with reconstituted high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 5264-5269 (1994)
- 74) Hakamata, H., Miyazaki, A., Sakai, M., Sugihara, Y., Sakamoto, Y. and Horiuchi, S.: Species difference in cholesteryl ester cycle and HDL-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Arterioscler. Thromb.*, **14**, 1860-1865 (1994)
- 75) Schmitz, G., Robenek, H., Beuck, M., Krause, R., Schurek, A. and Niemann, R.: Ca^{++}

- antagonists and ACAT inhibitors promote cholesterol efflux from macrophages by different mechanisms: I. characterization of cellular lipid metabolism. *Arteriosclerosis*, **8**, 46-56 (1988)
- 76) Kusunoki, J., Aragane, K., Kitamine, T., Higashinakagawa, S., Kase, N., Yamamura, T. and Ohnishi, H.: Hypocholesterolemic action and prevention of cholesterol absorption via the gut by F-1394, a potent acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor, in cholesterol diet-fed rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, **69**, 53-60 (1995)
- 77) Sakuma, Y., Hagiwara, H., Ohne, K., Nagayoshi, A., Mutoh, S., Ito, Y., Notsu, Y. and Okuhara, M.: Plasma cholesterol reducing effect of FR129169, a new acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor, in rat. *Jpn. J. Pharmacol.*, **70**, 35-41 (1996)
- 78) Nagata, Y., Yonemoto, M., Iwasawa, Y., Shimizu-Nagumo, A., Hattori, H., Sawazaki, Y. and Kamei, T.: N-[2-N'-pentyl-(6,6-dimethyl-2,4-heptadiynyl)amino]ethyl-(2-methyl-1-naphthylthio)acetamide (FY-087); a new acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor of diet-induced atherosclerosis formation in mice. *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 643-651 (1995)
- 79) Matsuo, M., Aketa, M., Ozaki, R., Tomoi, M. and Shimomura, K.: Cholesterol-lowering effect of an acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor, FR145237, in hypercholesterolemic rabbits fed a high-cholesterol diet and cholesterol-free casein diet. *Drug Dev. Res.*, **36**, 186-192 (1995)

謝 辞

稿を終えるにあたり、本論文の作成に終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました岡山大学薬学部 亀井千晃教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本稿の御校閲および数々の御助言を賜りました岡山大学薬学部 篠田純男教授ならびに川崎博己教授に深く感謝致します。また、多くの御助言を賜りました立命館大学理工学部 小野文一郎教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さるとともに、多大の御便宜、御鞭撻を賜りました日清食品株式会社代表取締役社長 安藤宏基氏、同専務取締役中央研究所長 山崎眞宏氏（現 監査役）、同常務執行役員中央研究所長 千葉 勝氏、同中央研究所室長 山田敏広氏（現 食品安全センター長）、同中央研究所課長 信原陽一氏に心より感謝の意を表します。また、本研究を進めるにあたり御協力いただきました日清食品株式会社中央研究所の諸氏に心から御礼申し上げます。

